



TITLE:

鉛の神経毒性に着目したヒト健康  
リスク評価手法の構築(  
Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

谷, 修祐

---

CITATION:

谷, 修祐. 鉛の神経毒性に着目したヒト健康リスク評価手法の構築. 京都大学, 2011, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2011-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k16063>

RIGHT:

鉛の神経毒性に着目した  
ヒト健康リスク評価手法の構築

2011 年

谷 修祐



# 目 次

## 第 1 章 序論

1.1 はじめに	1
1.2 鉛使用の歴史、性質、毒性	
1.2.1 鉛使用の歴史	2
1.2.2 鉛の性質	
1.2.2.1 鉛の物理化学的性質、鉛の同位体および元素存在度	3
1.2.3 鉛の毒性	
1.2.3.1 鉛毒性の概略	4
1.2.3.2 鉛による神経毒性	6
1.3 血液脳関門	7
1.4 本研究の目的と論文の構成	7
参考文献	

## 第 2 章 *in vitro* 血液脳関門実験モデルを用いた鉛化合物曝露における 経皮内電気抵抗値の測定並びに鉛の血液脳関門透過性の検討

2.1 はじめに	13
2.2 血液脳関門(Blood-Brain Barrier: BBB)と経皮内電気抵抗 (TransEndothelial Electrical Resistance: TEER)	13
2.3 <i>in vitro</i> 血液脳関門実験モデル	16
2.4 実験方法	
2.4.1 細胞	16
2.4.2 試薬	17
2.4.3 鉛化合物曝露による豚脳微小血管内皮細胞生存率試験	17
2.4.4 <i>in vitro</i> 血液脳関門実験モデルの作成	18
2.4.5 鉛化合物曝露における経皮内電気抵抗測定実験	19
2.4.6 経皮内電気抵抗値計算方法	19
2.4.7 ICP-MS を用いた <i>in vitro</i> 血液脳関門実験モデル での鉛透過量の測定	20
2.4.8 <i>in vitro</i> 血液脳関門実験モデルにおける鉛等加速度の計算	20

2.5	実験結果	
2.5.1	<i>in vitro</i> 血液脳関門実験モデルにおける経皮内電気抵抗値 増殖曲線	21
2.5.2	鉛化合物曝露による豚脳微小血管内皮細胞生存率試験結果	21
2.5.3	<i>in vitro</i> 血液脳関門実験モデルを用いた鉛化合物曝露における 経皮内電気抵抗測定実験結果	22
2.5.4	<i>in vitro</i> 血液脳関門実験モデルにおける鉛透過速度測定実験結果	24
2.6	考察	26
	参考文献	

### 第3章 鉛化合物曝露における神経細胞への毒性作用の検討

3.1	はじめに	35
3.2	神経細胞とグリア細胞	36
3.3	ラット由来のグリア細胞 C6 細胞および神経細胞 PC12 細胞、 ヒト由来グリア細胞 CCF-STTG1 細胞および神経細胞 NT2/D1 細胞 への鉛化合物毒性実験	
3.3.1	細胞	36
3.3.2	試薬	37
3.3.3	鉛化合物曝露によるラット由来グリア細胞 C6、神経細胞 PC12 およびヒト由来グリア細胞 CCF-STTG1、神経細胞 NT2/D1 細胞の生存率試験	37
3.4	実験結果	38
3.5	考察	42
	参考文献	

### 第4章 鉛の神経影響を考慮したヒト健康リスク評価

4.1	はじめに	47
4.2	PBPK モデルについて	47
4.3	鉛における PBPK モデル	50
4.4	鉛曝露によるヒト健康評価モデルの再構築	52

4.5	再構築したヒト健康リスク評価モデルによる健康リスク評価 シミュレーション	
4.5.1	脳コンパートメントモデルを追加した PBPK モデルの検証	55
4.5.2	脳-血漿移行パラメータの再設定	58
4.6	考察	
4.6.1	暫定週間耐容摂取量におけるシミュレーション	62
4.6.2	亜慢性毒性時のシミュレーション	63
4.6.3	急性毒性時のシミュレーション	63
	参考文献	
	Appendix 1	68
	第 5 章 結論	75
	謝辞	78



## 第1章 序論

### 1.1 はじめに

人類は有史以来、さまざまな金属を発見、採取、加工し、さまざまな分野の発展に役立ててきた。しかし、それぞれの金属が持つ有益な面が先行されるあまり、それらによって引き起こされるヒトへの有毒性、健康影響への視点については取りざたされることが少なかった。しかし、産業が発達するにつれその使用量も増加し、ヒトに曝露される時間も量も増えることとなった。

日本においても高度成長期と呼ばれる時期に、有機水銀を原因物質とした水俣病、カドミウムを原因物質とするイタイタイ病が公害病として社会問題となった。これらは工場排水による環境汚染が引き起こした公害病であるが金属による環境汚染の原因は工場排出物に限るものではない。さまざまな金属が製品として加工され、広く世の中に分布されたことにより、適切な廃棄が行われないことによる環境汚染も顕在化している。

鉛は扱いの容易さや、低融点といった性質のために全世界で使用されている。日本においても鉛蓄電池、鉛管といった通常の加工品の他にガソリンのアンチノック剤として[テトラエチル鉛](#)  $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$  が添加された有鉛ガソリンを長年の間使用し、自動車の排ガスから大気中に鉛が大量に放出されるという事態を引き起こしてきた(Thomas VM et al., 1999)。鉛による環境汚染が問題となるとともに、法規制の取り組みも進み、環境基本法における鉛の環境基準は土壌からの溶出基準は  $0.01\text{mg/L}$  以下(環境省, 1971, 1983)、地下水、公共用水については  $0.01\text{mg/L}$  以下(環境省, 1997)と定められた。また、水道水基準値は  $0.01\text{mg/L}$ (厚生労働省, 2003)、健康にかかわる有害物質の排水基準は  $0.1\text{mg/L}$ (環境省, 2006a)に規制され、土壌含有量規準も  $150\text{mg/kg}$ (環境省, 2002)と定められた。日本では 1975 年にレギュラーガソリンへの鉛添加が禁止された(環境省, 2006b)。これにより鉛の高濃度曝露における健康影響については改善されるようになった。しかし、現在においても鉛は使用されており、健康影響についても高濃度曝露において現れる影響から低濃度曝露において現れる影響へと人々の関心もシフトしている。また、日本に限らず鉛は世界中で使用されており、対策が必要である。WHO では鉛の週間許容摂取量を  $25\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{bw} \cdot \text{week})$  に設定している(World Health Organization: WHO, 1995)。

鉛におけるヒト健康影響の一つとして神経系への影響が知られている(Agency for Toxic Substances and Disease Registry: ATSER, 2007)。神経系への影響は高濃度曝露だけでなく低濃度曝露においてもその影響が報告されている。また、その影響は成人と幼児・小児を比較したとき、幼児・小児にその影響がよく表れるとされている(Lanphear et al., 2000, Canfield et al., 2004)。

一方、ヒトに対する健康リスク評価の方法として薬物動態モデルを利用し、各生体部位への鉛の移行量を推定する方法が研究開発され、O'Flaherty モデル(O'Flaherty, 1991a, 1991b, 1991c,



1993, 1995)、IEUBK モデル(Environmental Protection Agency: EPA, 1994a, 1994b, White et al., 1998)、Leggett モデル(Leggett, 1993)といったものが提唱されてきた。しかし、近年、鉛曝露によるヒト健康影響の一つである神経系への影響が重要なものとなり、また、その影響も成人よりも幼児・小児によく表れることが明らかになり、従来のモデルを改良する必要性が高くなっている。

ヒトに対する有害な健康影響を及ぼす物質は数多くあるが健康リスク評価を行うためにはさまざまなデータを収集する必要がある。本研究は生物学的手法を用いて鉛の神経毒性を解析し、ヒト健康リスク評価モデルの新たな枠組みを構築することを最終目標としている。

## 1.2 鉛使用の歴史、性質、毒性

### 1.2.1 鉛使用の歴史

鉛使用の歴史は古く、鉛が使用された装飾品の発掘などから約 5000 年前には使用されていたと推測されている。鉛は自然界に豊富に存在し、採掘も容易であることから世界中で使用され、容易に延ばしやすく、精練もしやすいという加工上の利点、腐食されにくいといった性質上の様々な利点を持つため、さまざまな用途に加工、使用されてきた。日本においても奈良時代にはすでに鉛が使用されていたという記載があり、日本においても 1000 年以上の使用の歴史を持つ金属であることが分かる(中島, 2007, 堀口, 1993)。

鉛が使用された分野は先に述べたように多岐にわたり、化粧品や飲料の品質保持に使用されていた時期もある(中島, 2007, 堀口, 1993, 綿貫, 1994)。現在では鉛蓄電池、無機薬品、はんだ、電線被覆、鉛管、鉛板、低融点合金、硬鉛、軸受合金、ターンプレート、活字合金、錘などの幅広い用途に使用されている(日本鉛亜鉛需要開発センター, 1992)。しかし、鉛はヒトに対する健康影響も報告されているため使用量の低減も同時に行われ、有鉛ガソリンの規制、無鉛はんだの利用促進、給水管としての利用停止といった取り組みがある。

しかし、鉛の供給量は 1980 年代後半をピークに減少傾向にあるものの(中西, 2006, 通商産業省大臣官房調査統計部, 1963), 経済産業省経済産業政策局調査統計部, 1949~2003)今現在も 20 万トンを超える量が供給されており、その使用量はほかの金属に比べて非常に大きいことには変わりがない。日本における鉛生産量の経年変化を図 1-1 に示す。

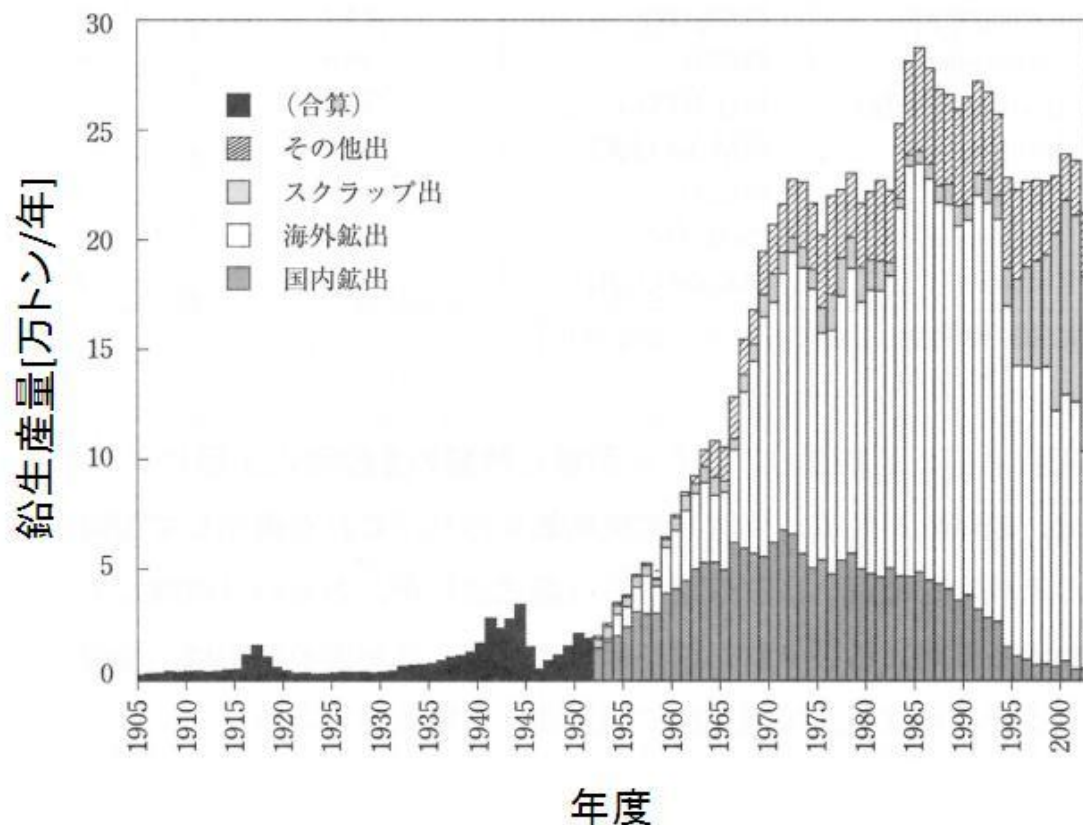


図 1-1. 鉛生産量の経年変化[中西(2006)より抜粋]

## 1.2.2 鉛の性質

### 1.2.2.1 鉛の物理化学的性質 鉛の同位体および元素存在度

鉛は原子番号 82 番で第 IV 属の元素である。原子量は 207.20、色は青みがかった灰色 (Bluish-gray)、個体の物理的状態を持つ。融点は 327.4℃、沸点は 1,740℃、20℃での密度は 11.34g/cm<sup>3</sup>である。

鉛は 3 つの酸化状態をとる。酸化状態によって Pb(0)、Pb(II)、Pb(IV)の 3 種に分けられるが環境中では主に 2 価の酸化状態である Pb(II)として存在している。過剰に酸化された状態である Pb(IV)は不安定な状態であるため、無機化合物としての Pb(IV)は自然界にはほとんど存在しない。しかし、有機鉛化合物については 2 価のものは知られておらず、4 価の状態がそのほとんどを占めている。金属鉛である Pb(0)も自然界に存在するがその量は極めて少ない(ATSDR, 2007, Budavari et al., 1996, HSDB, 2009, Lide et al., 1998)。

鉛は自然界に存在する天然元素であり、自然界の鉛は 4 つの安定同位体の混合物である。その種類は、<sup>208</sup>Pb、<sup>206</sup>Pb、<sup>207</sup>Pb、<sup>204</sup>Pb の 4 種類であり、それぞれの存在割合は <sup>208</sup>Pb:51~53%、<sup>206</sup>Pb:23.5~27%、<sup>207</sup>Pb:20.5~23%、<sup>204</sup>Pb:1.35~1.5%である。またこれらの同位体の中で、<sup>206</sup>Pb はウラン系列、<sup>207</sup>Pb はアクチニウム系列、<sup>208</sup>Pb はトリウム系列の最終的な崩壊生成物である

(ATSDR, 2007, Budavari et al., 1996, HSDB, 2009, Lide et al., 1998)。ケイ素原子  $10^6$  個に対する原子数である元素存在度によると鉛の地殻中の元素存在度は  $8\mu\text{g/g}$  である(日本化学会編, 2004)。また、地殻に含まれる鉛の量であるクラーク数は  $1.5 \times 10^{-3}$  重量%であり、地球上に存在するすべての元素のうち 36 番目に存在量が多い。鉛の基本的な物理化学的特性を表 1-1 に示す。

表 1-1. 鉛の物理化学的特性[中西(2006), ATSDR(2007)]

名称		鉛
化学式		Pb
分子量		207.20 (原子量)
物理的状态		個体
色		青みを帯びた灰色
融点		$327.4^{\circ}\text{C}$
沸点		$1,740^{\circ}\text{C}$
密度( $20^{\circ}\text{C}$ )		$11.34\text{g/cm}^3$
臭気		なし
溶解度	水	不溶
	硝酸	可溶
	熱濃硫酸	可溶
	有機溶媒	不溶
蒸気圧		$1.77\text{mmHg}$ ( $1000^{\circ}\text{C}$ )
原子価		0

### 1.2.3 鉛の毒性

#### 1.2.3.1 鉛毒性の概略

鉛についての毒性の歴史もその利用の歴史に伴い、さまざまな報告がされている。鉛中毒としては古くからよく知られ、主に鉛を扱う作業者の職業病、日本でも化粧品である含鉛白粉を利用していた役者の鉛中毒が報告されている(三浦, 1980)。以前は鉛による健康影響は鉛中毒としてひとくくりにされてきたが、疫学調査の蓄積や医学等の発達により、その影響が細かく分けられ、容量反応関係も含め多数の報告がされるようになった。以下にヒトに対する影響とその疫学的な報告を述べる。

心臓血管系への影響として Rothenberg らは 15 歳から 44 歳までの 667 人の妊婦への調査において踵骨鉛濃度が 10ppm に増加すると最高血圧が 0.7mmHg 高くなり、最低血圧が 0.54mmHg 高くなることを報告した (Rothenberg et al., 2002)。消化器系への影響は全米科学アカデミー (National Academic of Science: NAS) が血中鉛濃度 60-100 $\mu\text{g}/\text{dL}$  に達した子供たちに疝痛の症状があらわれていることをまとめた (NAS, 1972a, 1972b)。造血系への影響は Hernberg らが 159 人の成人を調査した結果、血中鉛濃度 5-95 $\mu\text{g}/\text{dL}$  の範囲内においてアミノレブリン酸脱水酵素 (aminolevulinic acid dehydratase: ALAD) 活性が低下することを報告し (Hernberg et al., 1970)、Schwartz らは 1 歳から 5 歳までの 579 人の子供たちを対象に血中鉛濃度を測定し、20 $\mu\text{g}/\text{dL}$  以上の濃度を示す子供たちに貧血の症状が見られることを報告した (Schwartz et al., 1990)。

筋骨格系への影響として Moss らは 2 歳から 11 歳の子供たちを調査した結果、2 歳から 5 歳では平均 2.9 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 、6 歳から 11 歳では 2.1 $\mu\text{g}/\text{dL}$  の血中鉛濃度を持つグループで血中鉛濃度が上昇するに従い、虫歯の本数が増加することを示した (Moss et al., 1999)。腎臓系への影響として Payton らは平均年齢 64 歳の男性 744 人の集団において、血中鉛濃度が 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$  を上回るとき、クレアチニンクリアランスが 10.4mL/minute に低下し、糸球体濾過率 (glomerular filtration rate: GFR) が低下したことを報告した (Payton et al., 1994)。また Kim らは平均年齢 57 歳の 459 人の男性の集団においてそれぞれの血中鉛濃度と血清中クレアチニン値を比較したとき、血中鉛濃度が 10 倍を超えると血清中クレアチニン値の増加に顕著な増加が見られたことを報告した (Kim et al., 1996)。

内分泌系の影響として López らは鉛の職業曝露を受けている 75 人の男性への調査から 50-98 $\mu\text{g}/\text{dL}$  の血中鉛濃度を示す対象において甲状腺機能および甲状腺ホルモン濃度を測定するのに使用される指標であるトリヨードサイロニン (T3) 接種率、血清総サイロキシン (T4) 量がそれぞれ低下することを示した (López et al., 2000)。免疫系への影響として Sun らは 38 人の 3 歳から 6 歳の子供たちへの調査において血中鉛濃度が 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$  以上になると IgE 抗体濃度が上昇し、IgG 抗体、IgM 抗体それぞれの濃度が低下したことと、その傾向は男児よりも女児において顕著であったことを報告した (Sun et al., 2003)。

生殖系の影響として Gennart らは鉛の職業曝露を受けている 74 人の男性に対して調査を行い全体に対する平均血中鉛濃度は 46.3 $\mu\text{g}/\text{dL}$  を示し、受精に対する能力が低下していたことを報告した (Gennart et al., 1992)。発達系への影響としては Ballew らは 1 歳から 7 歳までの幼児 4,391 人への調査で血中鉛濃度 1-72 $\mu\text{g}/\text{dL}$  の範囲においてその濃度が 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$  増加するごとに身長 1.57cm、頭囲 0.52cm の低下が見られたことを報告し (Ballew et al., 1999)、Wu らは 1,706 人の 8 歳から 16 歳の女児に対する調査で血中鉛濃度 1-22 $\mu\text{g}/\text{dL}$  の範囲で性成熟の遅延が起こったこ

とを報告した(Wu et al., 2003)。

鉛の発がん性に対して動物を用いた実験ではその作用機構は解明されていないが DNA 合成や修復の阻害、細胞間情報の変化、酸化損傷といった遺伝子毒性に関わりがない作用機構の報告がある(Silbergeld et al., 2000)。発がん性に対する情報はヒトにおいて不足しているがさまざまな機関が今までの知見に基づいた発がん性の評価を行っている。アメリカ環境保護庁 (United States Environmental Protection Agency : EPA) は無機鉛の発がん性の評価として Group 2B に区分し、ヒトに対する発がん性のおそれがあると発表した(Integrated Risk Information System(IRIS)(1993))。アメリカ保健福祉省 (United States Department of Health and Human Services) は鉛および鉛化合物のヒトに対する発がん性に関して発がん性が予想されると結論付けた(NTP, 2005)。また、国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer: IARC) は無機鉛に対してヒトに対する発がん性がおそらくある Group 2A(IARC, 2006)、金属鉛に対してはヒトに対する発がん性が疑われる Group 2B、有機鉛化合物に対してはヒトに対する発がん性が分類できない Group 3 に区分している(IARC, 1987)。

#### 1.2.3.2 鉛による神経毒性

1.2.3.2 で示したように鉛の毒性に関してはさまざまな報告があるが近年注目されているのが鉛の神経系への影響である。鉛の神経毒性として鉛脳症があるがこれは脳に対して影響を与える様々な疾病における一般的な用語として使用されてきた。初期の症状としては倦怠感、興奮性、注意力散漫、頭痛、筋振戦、記憶の欠如、幻覚といったものがあり、症状が進むと、突発性の精神錯乱、痙攣状態、麻痺状態、昏睡状態となり、最悪死に至る(Kumar et al., 1987)。このような鉛脳症の症状は成人だけでなく幼児・小児にも同様に見られる。深刻な鉛脳症の症状は成人では一般的に血中鉛濃度が非常に高濃度になった時に現れ、鉛の急性毒性の症状として現れる(Kehoe, 1961, Smith, 1938)。

Campara らは血中鉛濃度 45-60 $\mu$ g/dL の高濃度域を示す職業従事者において神経行動試験を行った結果、認識能力、視覚・運動能力、言語能力において血中鉛濃度が低濃度であったグループと比較すると、それらの能力が低下したことを報告している(Campara et al., 1984)。また Baker らは血中鉛濃度 40 $\mu$ g/dL 以上を示す労働者が言語能力、記憶能力、視覚・運動能力が低下したことを示した(Baker et al., 1983)。Maizlish らも鉛精練所で平均 4 年従事し、血中鉛濃度の平均値が 42 $\mu$ g/dL 示す 43 人のベネズエラ人労働者に対する神経行動試験を行い、同様の結果が得られていることを報告している(Maizlish et al., 1995)。

鉛による幼児・小児への影響に関しては近年、さらに低濃度で影響がおよぼされていることが報告されている。Lanphear らは 4853 人の 6 歳から 16 歳までの児童に対し、血中鉛濃度とさま

ざまな認識能力との関係を調査した。その結果、血中鉛濃度 7.5 $\mu\text{g}/\text{dL}$  以下において計算能力、読解能力、推理能力それぞれが血中鉛濃度と負の相関を示し、さらに、5.0 $\mu\text{g}/\text{dL}$  以下においても計算能力と読解能力は血中鉛濃度と負の相関を示していたことを報告した(Lanphear et al., 2000)。

Canfield らは 172 人の児童を対象に血中鉛濃度と IQ に対する調査を行い、幼児・小児期において血中鉛濃度が平均 1 $\mu\text{g}/\text{dL}$  増加すると IQ が 0.46 ポイント低下した。また、年齢を 3 歳から 5 歳に限定し、血中鉛濃度 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$  以下の集団で観察した場合は、血中鉛濃度 1 $\mu\text{g}/\text{dL}$  の増加で IQ が 1.37 ポイント低下することを報告した(Canfield et al., 2004)。

先に述べた鉛に対する許容摂取量および規制等により、日常における鉛の曝露量は低下している。しかし、鉛曝露による神経への影響は幼児・小児期において低濃度でもその影響が表れていることを考慮すると、神経毒性をエンドポイントとした健康リスク評価を行うことはさらに重要度が増している。

### 1.3 血液脳関門

中枢神経系は脳と脊髄からなっているが脳を取り巻く微小血管の内皮細胞はその細胞同士が強く結合し、物質の取り込みを制限している。この機構を血液脳関門といい、これにより脳内の環境が恒常的に保たれている。物質の取り込み、排出はさまざまなタンパクの関与や、輸送担体、イオンチャンネルによって制御されている(中川ら, 2009, 日本トキシコロジー学会教育委員会, 2002, F.H.マティーンら, 2003, Rubin et al., 1999)。

### 1.4 本研究の目的と論文の構成

本研究の最終目標は、鉛による神経毒性をエンドポイントとしたヒト健康リスク評価の枠組みを構築することである。この目標を達成するために、以下の研究目標を設定する。

- (1) 鉛の神経毒性に着目し、*in vitro* 血液脳関門モデルを用い、鉛が血液脳関門に与える影響、血液脳関門の透過性を明らかにすること。
- (2) グリア細胞、神経細胞を用いた実験を行いその生存率を解析することで細胞の種類の違いや、種差による影響を明らかにすること。
- (3) 従来の鉛に対するヒト健康リスク評価モデルの問題点を整理し、より有用なモデルに再構築すること。
- (4) 再構築したモデルを用い、神経毒性をエンドポイントとしたヒト健康リスクを評価すること。

鉛は多種多様な化合物形態をとるものの、水に対する溶解度は低いものが多い。一部は酸や有機溶媒に対する溶解性をもつものがあるが、本研究では様々な細胞を用いるため、それらの細胞に対する溶媒の影響を極力排除する必要がある。よって本研究では水に対する溶解度が比較的大きい鉛化合物として酢酸鉛(II)三水和物、硝酸鉛(II)、塩化鉛(II)の3種類を被験物質として使用した。それぞれの鉛化合物の物理化学的性質を表 1-2 に示す。

表 1-2. 本研究において使用する鉛化合物の物理化学的特性[中西(2006), ATSDR(2007)]

名称		酢酸鉛(II)三水和物	硝酸鉛(II)	塩化鉛(II)
化学式		$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	$\text{PbCl}_2$
分子量		379.33	331.21	278.11
物理的状态		個体	個体	個体
色		白	無色あるいは白	白
融点		280°C	470°Cで分解	501°C
沸点		200°Cで分解	情報なし	950°C
密度(20°C)		3.25g/cm <sup>3</sup>	4.53g/cm <sup>3</sup>	5.85g/cm <sup>3</sup>
臭気		わずかな酢臭	無臭	情報なし
溶解度	水	443,000mg/L (520°C)	376,500mg/L(0°C) 565,000mg/L(20°C)	9,900mg/L (20°C)
	硝酸	情報なし	不溶	情報なし
	熱濃硫酸	情報なし	情報なし	情報なし
	有機溶媒	グリセリンに可溶 アルコールにわずかに可溶	アルコールに可溶	アルコールに不溶
蒸気圧		情報なし	情報なし	1mmHg (547°C)
原子価		+2	+2	+2

## 参考文献

- Thomas VM, Cocolow RH, Fanelli JJ and Spiro TG, Effects of reducing lead in gasoline: an analysis of the international experience., 1999, Environmental Science & Technology, 33(22), p3942-3948.
- 環境省, 公害対策基本法 (昭和 42 年法律第 132 号) 第 9 条, 1971.
- 環境省, 環境基本法 (平成 5 年法律第 91 号) 第 16 条第 1 項, 1983.
- 環境省, 環境基本法第 16 条第 1 項, 1997.
- 厚生労働省, 水質基準に関する省令 (平成 15 年 5 月 30 日厚生労働省令第 101 号最終改正), 2003.
- 環境省, 水質汚濁防止法第 3 条第 1 項及び第 12 条の 3 (平成 18 年 6 月 14 日法律第 68 号最終改正), 2006a
- 環境省, 土壤汚染対策法 (平成 14 年 5 月 29 日法律第 53 号), 2002.
- 環境省, 大気汚染防止法第 19 条の 2 第 1 項 (平成一八年二月一〇日法律第五号最終改正), 2006b
- WHO, Environmental health criteria 165 Inorganic Lead, 1995.
- ATSDR, Toxicological profile for lead, 2007.
- O'Flaherty EJ, Physiologically based models for bone-seeking elements. I. Rat skeletal and bone growth., 1991, Toxicol Appl Pharmacol., 111(2), p299-312.
- O'Flaherty EJ, Physiologically based models for bone-seeking elements. II. Kinetics of lead disposition in rats., 1991, Toxicol Appl Pharmacol., 111(2), p313-331.
- O'Flaherty EJ, Physiologically based models for bone-seeking elements. III. Human skeletal and bone growth., 1991, Toxicol Appl Pharmacol., 111(2), p332-341.
- O'Flaherty EJ., Physiologically based models for bone-seeking elements. IV. Kinetics of lead disposition in humans., 1993, Toxicol Appl Pharmacol., 118(1), p16-29.
- O'Flaherty EJ., Physiologically based models for bone-seeking elements. V. Lead absorption and disposition in childhood., 1995, Toxicol Appl Pharmacol., 131(2), p297-308.
- EPA, Guidance manual for the integrated exposure uptake biokinetic model for lead in children., 1994a, U.S.Environmental Protection Agency., EPA540R93081, PB93963510.
- EPA, Technical support document: Parameters and equations used in integrated exposure uptake biokinetic model for lead in children(v0.99d)., 1994b, U.S.Environmental Protection Agency., EPA540R94040, PB94963505.
- White PD, Van Leeuwen P, Davis BD, Maddaloni M, Hogan KA, Marcus AH and Elias RW, The conception structure of the integrated exposure uptake biokinetic model for lead in children., 1998, Environ. Health Perspect., 106, p1513-1530.



- Leggett RW, An age-specific kinetic model of lead metabolism in humans., 1993, Environ. Health Perspect., 101, p598-616.
- 中島信久, 歴史シリーズ—鉛(1)—, 2007, 独立行政法人石油天然ガス・金属鉱物資源機構金属資源レポート, 37(3), p185-190.
- 堀口俊一, 「鉛」—環境中の鉛と生態影響—, 1993, 財団法人労働科学研究所出版部.
- 綿貫弘, 物が語る世界の歴史, 1994, 聖文新社.
- 鉛亜鉛需要開発センター, 鉛ハンドブック改訂版, 1992, 鉛亜鉛需要開発センター.
- 中西準子, 詳細リスク評価書シリーズ 9「鉛」, 2006, 丸善
- 通商産業大臣官房調査統計部編, 本邦工業の趨勢 50 年史, 1963, 財団法人通商産業調査会
- 経済産業省経済産業政策局調査統計部, 資源統計年報, 1949~2003, 経済産業統計協会
- Budavari SM, O'Neal J, Smith A and Heckelman PE, The Merck Index. 12th ed., 1996, Whitehall, NJ, Merck & Company, Inc.
- HSDB, Hazardous Substances Database. Lead. National Library of Medicine, 2009, <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~aPmP0o:1>.
- Lide DR and Frederikse HPR, CRC Handbook of Chemistry and Physics., 1998, New York, NY, CRC Press.
- 日本化学会編, 化学便覧基礎編改訂 5 版, 2004, 丸善, pI63-I64.
- 三浦豊彦, 労働と健康の歴史 第三巻, 1980, 労働科学研究所, p143-145
- Rothenberg SJ, Kondrashov V, Manalo M, Jiang J, Cuellar R, Garcia M, Reynoso B, Reyes S, Diaz M and Todd AC, Increase in hypertension and blood pressure during pregnancy with increase bone lead levels., 2002, Am J Epidemiol, 156, p1079-1087.
- NAS, Lead: Airborne lead in perspective., 1972a, Washington, DC: National Academy of Sciences, p71-177.
- NAS, Lead: Airborne lead in perspective., 1972b, Washington, DC: National Academy of Sciences, p281-313.
- Hernberg S, Nikkanen J, Mellin G and Lilius H,  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydrase as a measure of lead exposure., 1970, Arch. Environ. Health, 21, p140-145.
- Schwartz J, Landrigan PJ, Baker EL Jr, Orenstein WA and von Lindern IH, Lead-induced anemia: Dose-response relationships and evidence for a threshold., 1990, Am. J. Public Health, 80, p165-168.
- Moss ME, Lanphear BP and Auinger P, Association of dental caries and blood lead levels., 1999, JAMA, 281(24), p2294-2298.

- Kim R, Rotnitsky A, Sparrow D, Weiss S, Wager C and Hu H, A longitudinal study of low-level lead exposure and impairment of renal function. The normative aging study., 1996, JAMA, 275, p1177-1181.
- López CM, Piñeiro AE, Núñez N, Avagnina AM, Villaamil EC and Roses OE, Thyroid hormone changes in males exposed to lead in the Buenos Aires area (Argentina)., 2000, Pharmacol. Res. Commun., 42(6), p599-602.
- Sun L, Hu J, Zhao Z, Li L and Cheng H, Influence of exposure to environmental lead on serum immunoglobulin in preschool children., 2003, Environ. Res., 92, p124-128.
- Gennart J-P, Buchet J-P, Roels H, Ghyselen P, Ceulemans E, and Lauwerys R, Fertility of male workers exposed to calcium, lead or manganese., 1992, Am. J. Epidemiol., 135, p1208-1219.
- Ballew C, Khan LK, Kaufmann R, Mokdad A, Miller DT and Gunter EW, Blood lead concentration and children's anthropometric dimensions in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), 1988-1994, 1999, J. Pediatr., 134, p623-630.
- Wu T, Buck GM and Mendola P, Blood lead level and sexual maturation in U.S. girls: The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994., Environ. Health Perspect., 2003, 111(5), p737-741.
- Silbergeld EK, Waalkes M and Rice JM, Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action., 2000, Am. J. Ind. Med, 38, p316-323.
- IRIS, Lead and compounds (inorganic) (CASRN 7439-92-1)., 1993, U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC: Integrated Risk Information System., [Online]<http://www.epa.gov/ncea/iris/subst/0277.htm>.
- NTP, Report on carcinogens. 11th ed. Lead (CAS No. 7439-92-1) and Lead Compounds, 2005, National Toxicology Program.
- IARC, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans volume 87: Inorganic and organic lead compounds., 2006, International Agency for Research on Cancer.
- IARC, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans Supplement No.7: Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs volumes 1 to 42, 1987, International Agency for Research on Cancer.

- Kumar S, Jain S, Aggarwal CS and Ahuja GK, Encephalopathy due to inorganic lead exposure in an adult., 1987, Jpn. J Med., 26, p253-254.
- Kehoe RA, The metabolism of lead in man in health and disease: Present hygienic problems relating to the absorption of lead: The Harben lectures, 1960., 1961, J. R. Inst. Public. Health Hyg. 24, p177-203.
- Smith FL II, Rathmell TK and Marcil GE, The early diagnosis of acute and latent plumbism., 1938, Am. J. Clin. Pathol., 8, p471-508.
- Campara P, D'Andrea F, Micciolo R, Savonitto C, Tansella M and Zimmermann-Tansella C, Psychological performance of workers with blood-lead concentration below the current threshold limit value., 1984, Int. Arch. Occup Environ. Health, 53, p233-246.
- Baker EL, Feldman RG, White RF and Harley JP, The role of occupational lead exposure in the genesis of psychiatric and behavioral disturbances., 1983, Acta. Psychiatr. Suppl., 67, p38-48.
- Maizlish NA, Parra G, Feo O, Newrobehavioral evaluation of Venezuelan workers exposed to inorganic lead., 1995, Occup. Environ. Med., 52, p408-414.
- Lanphear BP, Dietrich K, Auinger P and Cox C, Cognitive deficits associated with blood lead concentrations <10µg/dL in US children and adolescents., 2000, Public Health Rep., 115(6), p521-529.
- Canfield RL, Henderson CR Jr, Cory-Slechta DA, Cox C, Jusko TA and Lanphear BP, Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microgram per deciliter., 2003, N. Engl. J. Med., 348(16), p1517-1526.
- 中川慎介, 丹羽正美, 血液脳関門(BBB), 2009, 日本理誌, 133(170), p170-172.
- ニホントキシコロジー学会教育委員会編集, トキシコロジー, 2002, 朝倉書店.
- F.H.マティーニ, M.J.ティモンズ, M.P.マッキンリ 著, 井上貴央 監訳, カラー人体解剖学構造と機能: ミクロからマクロまで, 2003, 西村書店.
- Rubin LL, Staddon JM, The cell biology of the blood-brain barrier., 1999, Annu. Rev. Neurosci., 22, p11-28.

## 第2章 *in vitro*血液脳関門実験モデルを用いた鉛化合物曝露における経皮内電気抵抗値の測定並びに鉛の血液脳関門透過性の検討

### 2.1 はじめに

鉛曝露によりさまざまなヒト健康影響が引き起こされることがすでに述べた。鉛の曝露経路は吸入曝露、経口曝露が考えられるがその後は血中へと取り込まれ全身に分布する。鉛が中枢神経に影響を及ぼすためには脳内に鉛が取り込まれる必要があるが、脳を取り巻く微小血管と脳との間での物質のやり取りは血液脳関門(Rubin et al., 1999, 中川ら, 2009)という生体機能により厳しく制限されている。鉛が脳内に取り込まれるためには、この血液脳関門を透過しなければならない。化学物質の血液脳関門透過性についての研究は *in vivo* で行われてきたが(Boje, 2001, Fraser et al., 1990, Zlokovic et al., 1986, Rapoport et al., 1979) 最近では様々な細胞を用いた *in vitro* での研究もおこなわれるようになった(Cecchelli et al., 1999, Jeliazkova-Mecheva et al., 2003, Raub et al., 1992, Lee et al., 2004)。そこで本章では *in vitro* 血液脳関門実験モデルを用いて血液脳関門の有効性を示す指標の一つである経皮内電気抵抗を測定することにより鉛が血液脳関門に与える影響を明らかにする。

また、経皮内電気抵抗値は血液脳関門を形成するタイトジャンクションの数に依存するため、経皮内電気抵抗値の低下は血液脳関門の機能低下に直結する。このことにより、血液脳関門の開放に影響を及ぼした鉛が血液脳関門を透過する可能性がある。そこで同様の実験モデルを用いて血液脳関門を通過する鉛の量を定量し、鉛透過量における濃度曲線から血液脳関門における鉛透過速度を求めることも目的に掲げる。

具体的には血液脳関門と経皮内電気抵抗、本研究で用いる *in vitro* 血液脳関門実験モデルについて説明し、そのモデルの作成方法を述べる。次にモデルに用いる細胞である豚脳微小血管内皮細胞の鉛化合物に対する生存率試験を行い、経皮内電気抵抗測定実験において曝露する鉛化合物濃度を決定する。そして作成した *in vitro* 血液脳関門実験モデルに対して鉛化合物曝露を行い、鉛化合物濃度、曝露時間に対応した経皮内電気抵抗を測定し、その値から経皮内電気抵抗値を計算する。また、鉛透過性に関しては同様のモデルを用い酢酸鉛(II)三水和物を曝露する。その後、定期的にサンプルを回収し、高周波誘導プラズマ質量分析装置 (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: ICP-MS) を用いて、豚脳微小血管内皮細胞層を透過する鉛濃度を定量した。その結果から豚脳微小血管内皮細胞層に対する鉛透過速度を計算した。

### 2.2 血液脳関門(Blood-Brain Barrier: BBB)と経皮内電気抵抗(TransEndothelial Electrical Resistance: TEER)

血液脳関門は 1885 年、ドイツ人の微生物学者である、Paul Ehrlich がラットの血管に色素で

あるトリパンブルーを注入した実験を行い、脳および脊髄の中樞神経系にかかわる臓器は染色されず、その他の臓器が染色されることを確認したことでその存在が注目されるようになった(Ehrlich, 1885, 1904, Goldman, 1909)。その後、Edwin Goldman がラットのくも膜下腔にトリパンブルーを注入した実験を同様にを行い、脳および脊髄が染色され、その他の臓器は染色されなかったことを示した(Goldman, 1913)。以上の結果から血流と脳の間には物質を通さない機構があることが示され、血液脳関門(Blood-Brain Barrier)と名付けられた。最終的にその存在は電子顕微鏡による細胞観察によって確認された(Reese et al., 1967, Clawson et al., 1966, Donahue et al., 1964, Lampert et al., 1965)。

血液脳関門は脳にとって防御と育成のための役割を持つ。脳微小血管内皮細胞はタイトジャンクションと呼ばれる細胞間密着結合によって互いに隙間なく接している。この構造によって小さな分子や脂溶性の分子は透過することができるものの、ほぼすべての分子が血液から脳へ透過することが妨げられている。また、親水性の分子は能動輸送によって脳内へ透過することができる(Rowland et al., 1992)。ブドウ糖やアミノ酸といった脳にとって必要な栄養素は脳微小血管内皮細胞に存在する膜タンパクによって選択的に取り込まれている(Rubin et al., 1999, 中川ら, 2009)。主な膜タンパクの一つである p-glycoprotein は脳微小血管に比較的高濃度で存在している。P-glycoprotein は微小血管内皮細胞や脳内に入り込んだ物質を血液内に戻す役割を担っている(Cordon-Cardo et al., 1989, Thiebaut et al., 1989)。

脳毛細血管内皮細胞は、アストロサイトの足突起とペリサイトによってとり囲まれている。これらの細胞間の連携によって血液脳関門の機能は維持されている。そしてアストロサイトの別の終足の先に神経細胞があり、物質が神経細胞にいたるまでには複雑な経路をたどることとなる(中川ら, 2009, 馬場, 2007)。

しかし、脳を取り巻く血管のすべての部分に血液脳関門が存在するわけではなく、脳室周辺部にある脳下垂体、正中隆起、最後野、松果体、脳弓下器官、終板といった部分には血液脳関門が存在しない。これらの器官はホルモンを調節する役割にかかわっているためそのやり取りを容易に行うため血液脳関門が存在しないといわれている(Weiss et al., 2009)。また、幼児・小児は脳の大部分において血液脳関門が未発達であり、その機能が不十分である(Butt et al., 1990, Virgintino et al., 2004)。図 2-1 に脳微小血管およびその他の微小血管との違いを示す模式図、図 2-2 に血液脳関門の模式図を示す。

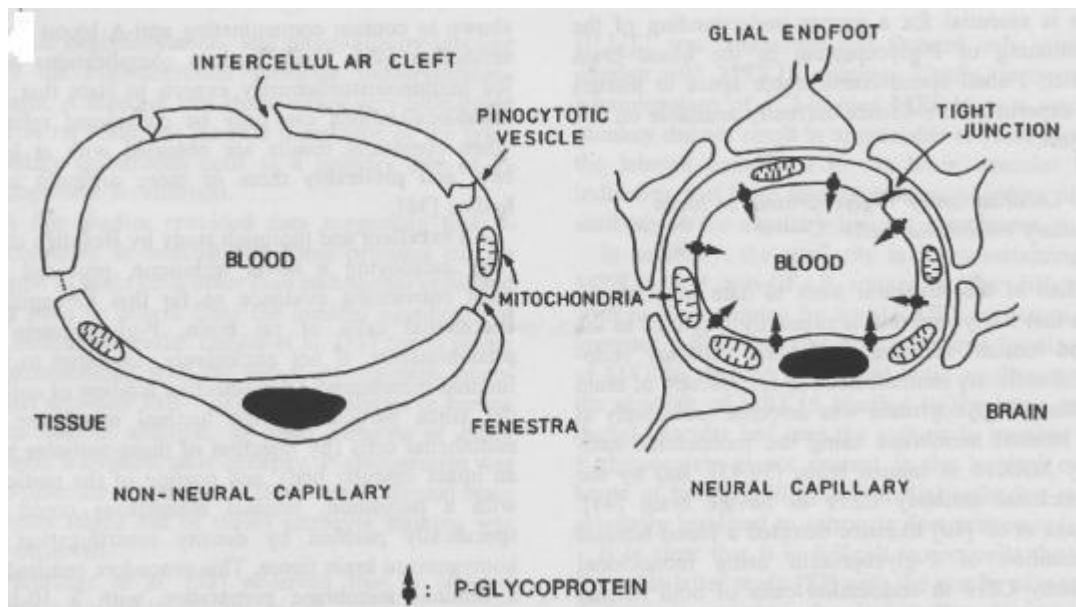


図 2-1. 脳微小血管およびその他の微小血管との比較[Schinkel(1999)より抜粋]

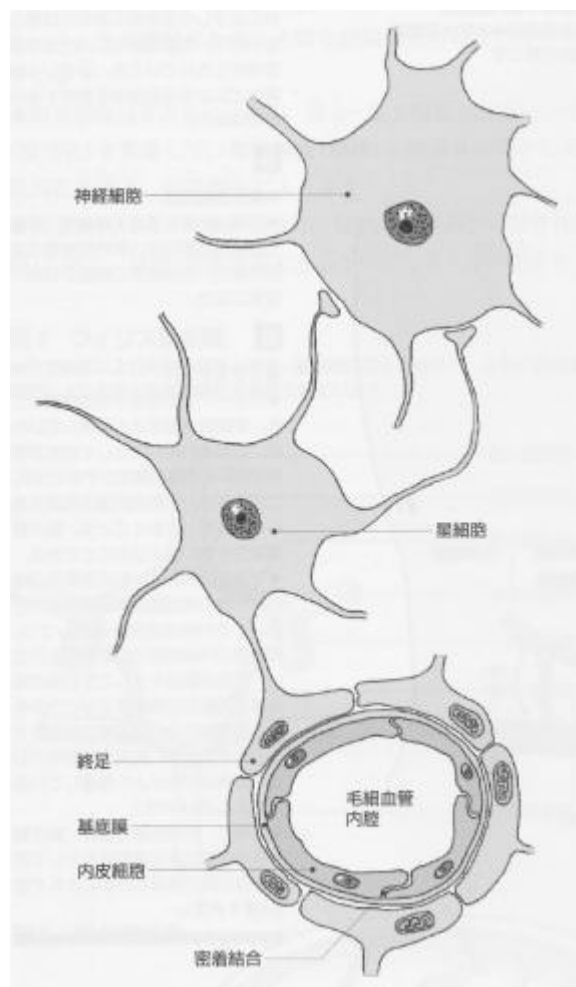


図 2-2. 血液脳関門の模式図[馬場(2007)より抜粋]

経皮内電気抵抗 (Transendothelial electrical resistance: TEER) の測定は血液脳関門のタイトジャンクションの機能性を定量化するための簡便な方法である。経皮内電気抵抗は脳微小血管内皮細胞の間のタイトジャンクションを透過する小さなイオンの透過性によってその値が決定される(Crone et al., 1981, 1978, 1982)。経皮内電気抵抗の絶対値は主に細胞の間のタイトジャンクションの量と複雑性に依存しているとされている(Gonzalez-Mariscal et al., 1985, Cereijido et al., 1982)。よって、*in vitro* 血液脳関門モデルの経皮内電気抵抗を測定することによって被験物質のタイトジャンクションへの影響を見ることができる。

### 2.3 *in vitro* 血液脳関門実験モデル

血液脳関門を模したモデルに使用される細胞には初代培養細胞を使用するものから株化細胞を使用するものといった様々なものがある(Cecchelli et al., 1999, Biernacki et al., 2005, Coisne et al., 2005, Meyer et al., 1990, Perriere et al., 2007, Persidsky et al., 1997, Roux et al., 1994, Durieu-Trautmann et al., 1991, Laschinger et al., 2000, Weksler et al., 2005)。Bowman らは牛脳微小血管細胞を分離培養し、*in vitro* 血液脳関門モデルを構築した(Bowman et al., 1983)。Tewes らは Bowman らの方法をもとに豚脳微小血管内皮細胞を分離培養し、豚脳微小血管内皮細胞が容易かつ十分な量が得られることを示し、また、豚の生理学的機能がヒトのものと相関があることを示した(Tewes et al., 1997, Erben et al., 1995, Wegener et al., 1996)。本研究では Cecchelli らの方法(Cecchelli et al., 1999)を参照し、セルカルチャーインサートのメンブレン上に豚脳微小血管内皮細胞の単層膜を形成し、*in vitro* 血液脳関門実験モデルを構築する方法を用いた。

## 2.4 実験方法

### 2.4.1 細胞

本実験で使用する豚脳微小血管内皮細胞の株化細胞である CS-2PB-C75 細胞は大日本住友製薬株式会社より購入した。CS-C Complete Medium Kit は大日本住友製薬株式会社より購入し、CS-C Complete Defined Medium 500ml に Defined Cell Boost 10ml を添加し培養液として使用した。培養条件は 37℃、CO<sub>2</sub>濃度 5%、湿度 100%である。

セルカルチャーインサート(直径 30mm、メンブレンポアサイズ 0.4μm) および 6 穴プレートは日本ベクトンディッキンソン株式会社より購入した。96 穴プレート、セルカルチャーフラスコは IWAKI 社製のものを使用した。

## 2.4.2 試薬

本実験に使用した鉛化合物の酢酸鉛(II)三水和物、硫酸鉛(II)、塩化鉛(II)は和光純薬株式会社より購入した。それぞれの鉛化合物は滅菌した超純水を用いて溶解し、0.2μm フィルターを用いて濾過滅菌を行った。その後、最終濃度 10nM、100nM、1μM、10μM、100μM となるように調整し、生存率試験に使用した。また、最終濃度 0.5μM、1μM、5μM、10μM となるように調整したものを経皮内電気抵抗測定実験に使用した。また、最終濃度 1μM、10μM に調整した酢酸鉛(II)三水和物水溶液を鉛透過量測定実験に使用した。

PBS (Phosphate Buffered Salts) タブレットはタカラバイオ株式会社より購入した。Trypsin-EDTA はナカライテスク株式会社より、Cell Counting Kit-8 は同仁化学研究所株式会社よりそれぞれ購入した。

原子吸光分析用インジウム標準液 (1000ppm) は和光純薬株式会社より購入し、サンプルに最終濃度 100ppb (0.1ppm) になるように調整し、鉛透過量測定実験の内標準物質として使用した。

## 2.4.3 鉛化合物曝露による豚脳微小血管内皮細胞生存率試験

経皮内電気抵抗測定実験を行うに当たり、鉛化合物曝露濃度を決定するために *in vitro* 血液脳関門実験モデルに使用する細胞である豚脳微小血管内皮細胞に鉛化合物水溶液を曝露し、生存率試験を行った。その方法を以下に示す。

豚脳微小血管内皮細胞を 75cm<sup>2</sup> 培養フラスコ内で CS-C Complete Medium を用いコンフルエント状態になるまで培養した。その後、トリプシンを用いて細胞をフラスコ底面から剥離し、118 × g で 10 分間の遠心分離を行い細胞を回収後、CS-C Complete Medium を用いて細胞濃度 2 × 10<sup>5</sup> cells/ml の濃度に再懸濁した。96 穴プレートのそれぞれのウェルに細胞懸濁液 100μl を添加し (2 × 10<sup>4</sup> cells/well)、37℃、CO<sub>2</sub> 濃度 5%、湿度 100% の条件下で 24 時間の前培養を行った。前培養後、各濃度の鉛化合物 10μl を各ウェル内の培地に添加し、37℃、CO<sub>2</sub> 濃度 5%、湿度 100% の条件下で 48 時間の曝露処理をおこなった。曝露処理後 Cell Counting Kit-8 溶液 10μl を 96 穴プレートの各ウェルに添加し、37℃で 3 時間静置し呈色反応をおこなった後、マイクロプレートリーダー Model 550 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, U.S.A.) を用いて波長 450nm (参考波長 : 650nm) での吸光度を測定した。細胞生存率は (2-1) 式より求めた。

$$\text{Cell Viability(\%)} = \frac{I_{\text{sample}} - I_{\text{blank}}}{I_{\text{control}} - I_{\text{blank}}} \times 100 \quad (2-1)$$

$I_{\text{sample}}$  : 鉛化合物を曝露した細胞のウェル吸光度

$I_{\text{control}}$  : 鉛化合物を曝露していない細胞のウェル吸光度

$I_{\text{blank}}$  : 培地のみのウェル吸光度



#### 2.4.4 *in vitro* 血液脳関門実験モデルの作成

豚脳微小血管内皮細胞を CS-C Complete Medium 内にて  $75\text{cm}^2$  培養フラスコを用い、コンフルエント状態になるまで培養した。その後、トリプシンを用いて細胞をフラスコ底面から剥離し、 $118\times g$  で 10 分間の遠心分離にて回収後、培地を用いて  $5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$  の濃度に再懸濁した。6 穴プレートに 3ml の CS-C Complete Medium を添加後、セルカルチャーインサートを装着し、細胞懸濁液 2ml をセルカルチャーインサート内に添加した ( $1 \times 10^6 \text{ cells/well}$ )。その後室温で 30 分静置し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  濃度 5%、湿度 100% の条件下にて培養を行い Millicell-ERS (Millipore, U.S.A., MA) を用い、1 日ごとの経皮内電気抵抗を測定した。Tewes らは月齢 6 ヶ月の豚の脳より分離した微小血管内皮細胞の最大経皮内電気抵抗値の平均は  $120 \Omega\cdot\text{cm}^2$  と報告している (Tewes B et al., 1997)。よって本章では経皮内電気抵抗値が  $120\Omega\cdot\text{cm}^2$  を超えるものを *in vitro* 血液脳関門実験モデルとして、鉛化合物曝露における経皮内電気抵抗測定実験に使用した。図 2-3 に *in vitro* 血液脳関門モデルの概要図、図 2-4 に経皮内電気抵抗測定の概略図を示す。

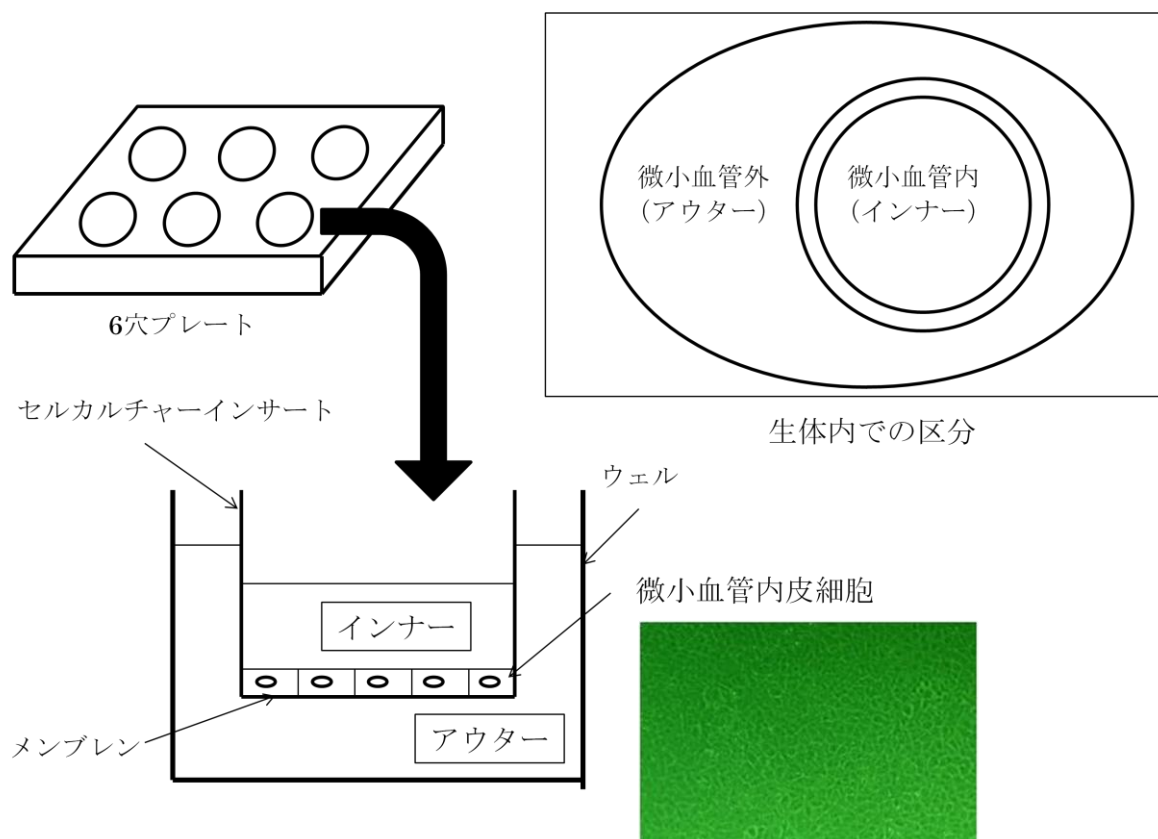


図 2-3. *in vitro* 血液脳関門実験モデル

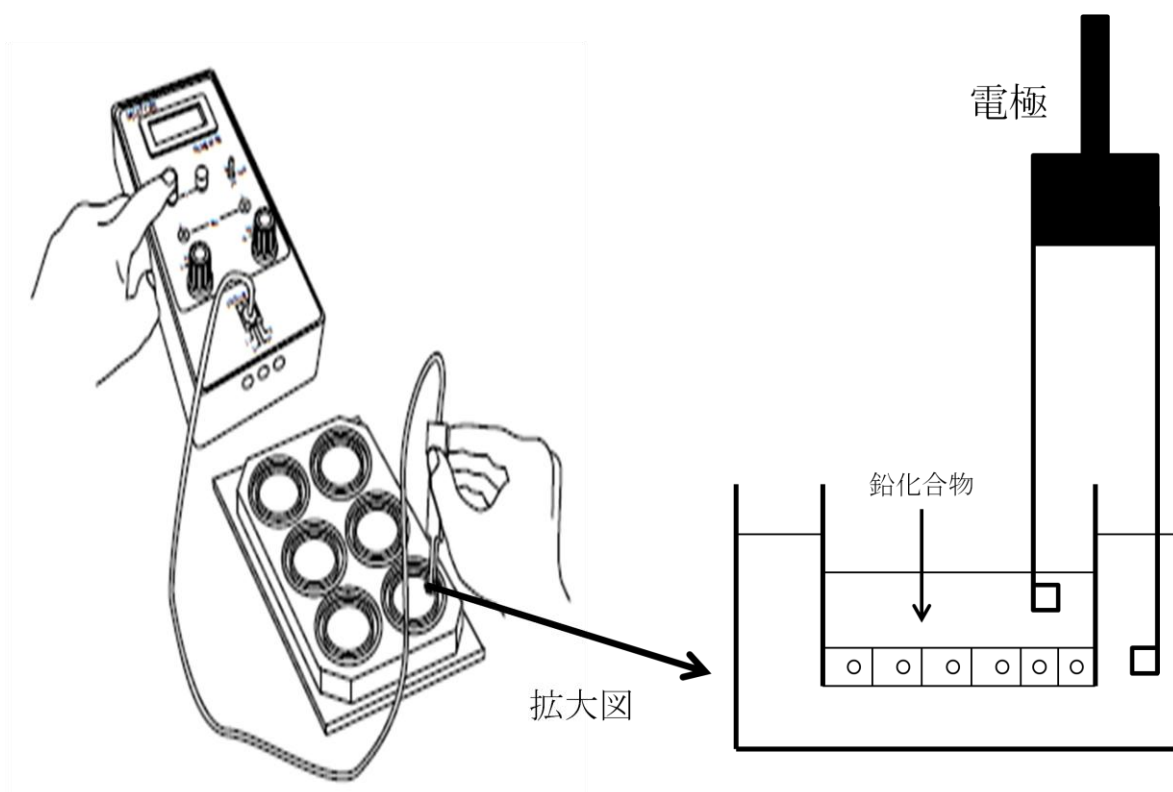


図 2-4. Millicell-ERS を用いた経皮内電気抵抗測定の概略図

#### 2.4.5 鉛化合物曝露における経皮内電気抵抗測定実験

初めに作成した *in vitro* 血液脳関門モデルのウェル側、セルカルチャーインサート側の培地をすべて取り除き、新しい培地をモデル作成と同条件の要領で添加した。その後、セルカルチャーインサート内の培地に各濃度に調整した鉛化合物水溶液 2 $\mu$ l をそれぞれ添加し、37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub>濃度 5%、湿度 100%の条件下で曝露処理を行い、1 時間ごと 6 時間までの経皮内電気抵抗を Millicell-ERS を用いて測定した。セルカルチャーインサートのメンブレン上に微小血管内皮細胞を含まない培地を加えたウェルをブランクウェルとし、計算方法は以下に示す(2-2)式 ～(2-5)式を用い経皮内電気抵抗値を計算した。

#### 2.4.6 経皮内電気抵抗値計算方法

(1)細胞層を形成しない培地のみでの値を測定しブランク値とする。

$$R_{\text{blank}} = A [\Omega] \quad \cdots (2-2)$$

(2)細胞層を形成したサンプル抵抗値を測定しサンプル抵抗値とする。

$$R_{\text{sample}} = B [\Omega] \quad \cdots (2-3)$$

(3)サンプル抵抗値(3)からブランク抵抗値(2)を引き算し、細胞層抵抗値を求める。

$$R_{\text{sample}} - R_{\text{blank}} = R_{\text{cell monolayer}}$$

$$B [\Omega] - A [\Omega] = C [\Omega] \quad \cdots (2-4)$$

(4)メンブレン全体の抵抗値を求めるため式(2-4)で得られた値 ( $C [\Omega]$ ) にメンブレンの有効面積をかけ、セルカルチャーインサート全体での経皮内電気抵抗値  $D [\Omega \cdot \text{cm}^2]$  を計算した。本実験に使用した 6 穴プレート用 Cell Culture Insert (Becton Dickinson, NJ, U.S.A.) のメンブレン有効面積は  $S = 4.2 \text{cm}^2$  である。

$$R_{\text{cell monolayer}} \times S [\text{cm}^2] = C [\Omega] \times 4.2 \text{cm}^2 = D [\Omega \cdot \text{cm}^2] \quad \cdots (2-5)$$

#### 2.4.7 ICP-MS を用いた *in vitro* 血液脳関門実験モデルでの鉛透過量の測定

2.4.4 で作成した *in vitro* 血液脳関門実験モデルのインサート内に各濃度に調整した酢酸鉛(II) 三水和物水溶液  $2 \mu\text{l}$  を添加した。その後 6 日間、1 日ごとに 6 穴プレートのウェル側培地を  $0.5 \text{ml}$  採取し、超純水で 10 倍に希釈した後、 $0.45 \mu\text{m}$  のフィルター (アドバンテック東洋株式会社、東京) を用いて濾過し、これを鉛の定量用サンプルとした。

鉛の定量には、ICP-MS 分析装置 HEWLETT PACKARD 4500 SERIES を用いた。定量方法には、絶対検量線法とインジウムを内標準物質とした内標準法を併用した。

#### 2.4.8 *in vitro* 血液脳関門実験モデルにおける鉛透過速度の計算

*in vitro* 血液脳関門実験モデルを透過する鉛の定量分析実験で得られた結果及び検量線から ICP-MS のカウント値に対する鉛濃度を求め、経過日数に対する鉛透過量のグラフをそれぞれ描いた。そのグラフから鉛濃度が定常状態になる日数を求め、その日数における初期鉛濃度と鉛透過量を対応させたグラフを作成し、そのグラフの回帰直線の傾きから *in vitro* 血液脳関門実験モデルにおける鉛透過速度を計算した。

## 2.5 実験結果

### 2.5.1 *in vitro* 血液脳関門実験モデルにおける経皮内電気抵抗値増殖曲線

*in vitro* 血液脳関門実験モデル作成時における経皮内電気抵抗値の増殖曲線を図 2-5 に示す。

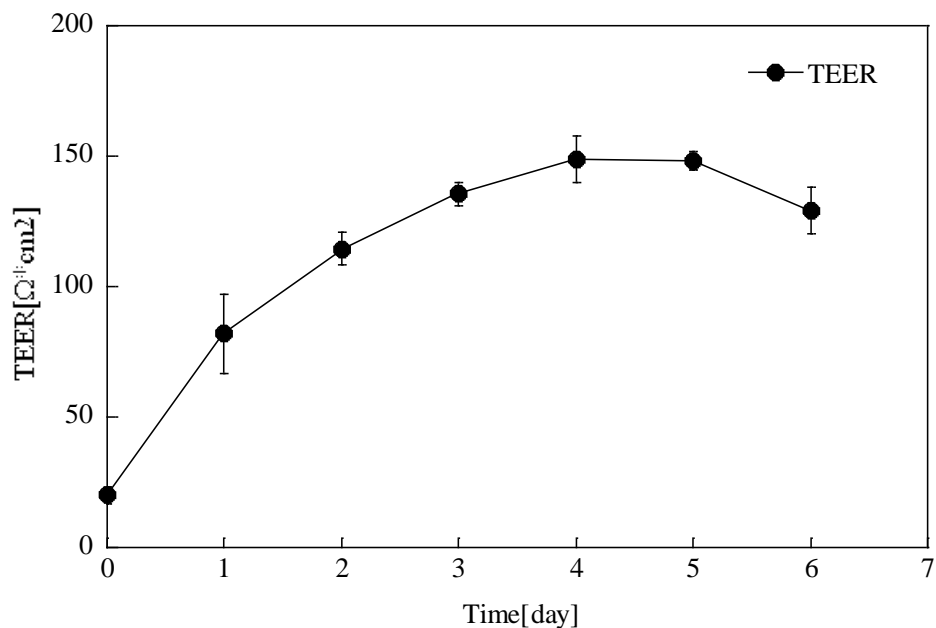


図 2-5. *in vitro* 血液脳関門実験モデルにおける経皮内電気抵抗値増殖曲線

*in vitro* 血液脳関門実験モデルにおける経皮内電気抵抗値はモデル作成時  $20 \Omega \cdot \text{cm}^2$  であり、その後、1 日後は  $81.9 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 、2 日後は  $114.50 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 、3 日後は  $135.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 、4 日後には  $149.10 \Omega \cdot \text{cm}^2$  に到達した。その後、5 日後は  $148.10 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 、6 日後は  $129.20 \Omega \cdot \text{cm}^2$  を示した。モデル作成時から 3 日目までは経皮内電気抵抗値は増加を示し、その後は定常状態を示した。

### 2.5.2 鉛化合物曝露による豚脳微小血管内皮細胞生存率試験結果

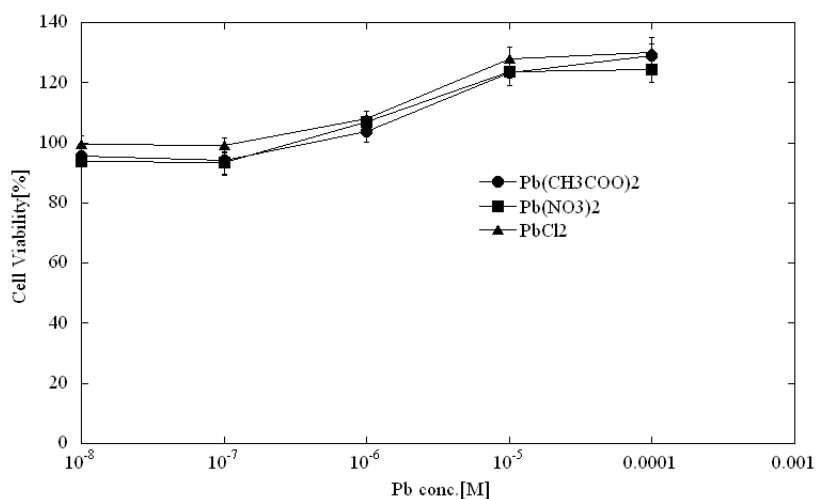


図 2-6. 鉛曝露における豚脳微小血管内皮細胞 CS-2PB-C75 の生存率

鉛化合物曝露による豚脳微小血管内皮細胞生存率試験結果を図 2-6 に示す。それぞれの鉛化合物、濃度 10nM から 100μM においてコントロールと比較した豚脳微小血管内皮細胞への生存率は、酢酸鉛(II)三水和物で 95.5%から 129.0%、硝酸鉛(II)で 93.8%から 124.5%、塩化鉛(II)で 99.6%から 130.2%となり、鉛化合物濃度に対する生存率低下への変化は見られなかった。

### 2.5.3 *in vitro* 血液脳関門実験モデルを用いた鉛化合物曝露における経皮内電気抵抗測定実験結果

*in vitro* 血液脳関門実験モデルを用いた鉛曝露における経皮内電気抵抗測定実験で得られた結果を図 2-7～図 2-9 にそれぞれ示す。

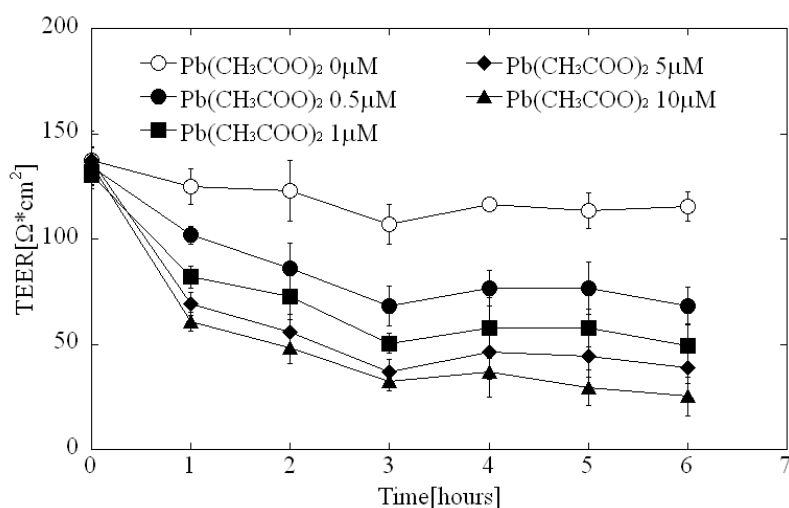


図 2-7. 酢酸鉛(II)三水和物曝露における経皮内電気抵抗値

図 2-7 に示されるように酢酸鉛(II)三水和物曝露においてコントロールの経皮内電気抵抗値は実験開始時 137.6Ω·cm<sup>2</sup>を示し、6 時間後 115.5 Ω·cm<sup>2</sup>を示した。酢酸鉛(II)三水和物濃度 10μM の曝露において経皮内電気抵抗値は 135.5 Ω·cm<sup>2</sup>から、6 時間後 25.2Ω·cm<sup>2</sup>へと低下した。それぞれ実験開始時と比較し低下割合を求めると、コントロールで 83.9%、酢酸鉛(II)三水和物 10μM で 18.6%となった。また、酢酸鉛(II)三水和物 0.5μM、1μM、5μM ではそれぞれ実験開始時 134.4 Ω·cm<sup>2</sup>、130.2 Ω·cm<sup>2</sup>、137.6 Ω·cm<sup>2</sup>であった経皮内電気抵抗値が 6 時間後に 68.3Ω·cm<sup>2</sup>、49.4 Ω·cm<sup>2</sup>、38.9Ω·cm<sup>2</sup>に低下した。それぞれの実験開始時の抵抗値に対する低下割合は 51%、37.9%、28.3%となった。

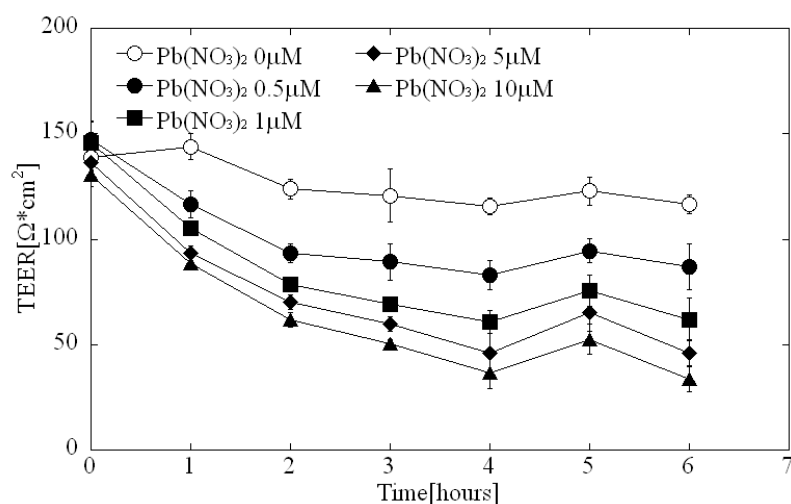


図 2-8. 硝酸鉛(II)曝露における経皮内電気抵抗値

図 2-8 に示されるように硝酸鉛(II)曝露においてコントロールの経皮内電気抵抗値は実験開始時  $138.6\Omega\cdot\text{cm}^2$  から 6 時間後  $116.6\Omega\cdot\text{cm}^2$  に低下し、その減少割合は 84.1%であった。硝酸鉛  $10\mu\text{M}$  の曝露においては、実験開始時  $130.2\Omega\cdot\text{cm}^2$  から 6 時間後、 $33.6\Omega\cdot\text{cm}^2$  に低下し、その減少割合は 25.8%となった。硝酸鉛(II)  $0.5\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$  それぞれの曝露においては、経皮内電気抵抗値は実験開始時それぞれ  $147.0\Omega\cdot\text{cm}^2$ 、 $146.0\Omega\cdot\text{cm}^2$ 、 $136.5\Omega\cdot\text{cm}^2$  から 6 時間後、 $87.2\Omega\cdot\text{cm}^2$ 、 $62.0\Omega\cdot\text{cm}^2$ 、 $46.2\Omega\cdot\text{cm}^2$  に低下した。それぞれの実験開始時の抵抗値に対する低下割合は 59.3%、42.5%、33.8%となった。

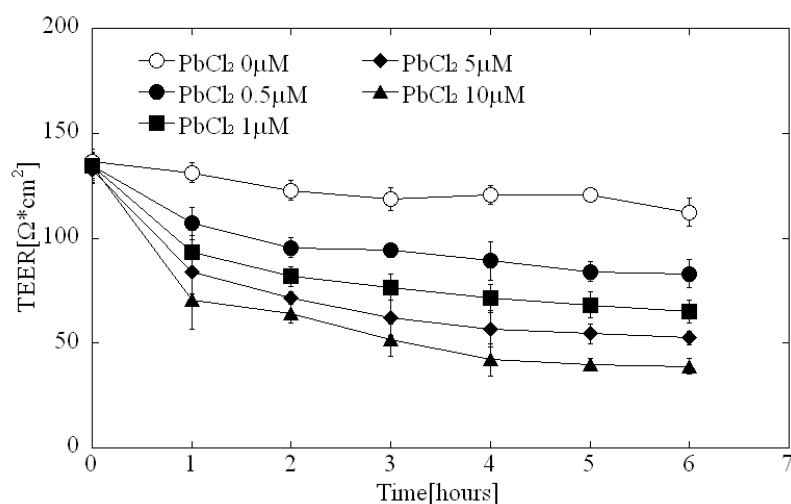


図 2-9. 塩化鉛(II)曝露における経皮内電気抵抗値

図 2-9 に示されるように塩化鉛(II)曝露においてコントロールの経皮内電気抵抗値は実験開始時  $136.5\Omega\cdot\text{cm}^2$  から 6 時間後  $112.4\Omega\cdot\text{cm}^2$  に低下した。また、塩化鉛(II)  $10\mu\text{M}$  の曝露において経

皮内電気抵抗値は実験開始時の  $134.4\Omega\cdot\text{cm}^2$  から 6 時間後  $38.9\Omega\cdot\text{cm}^2$  に低下した。それぞれの低下割合は、コントロールで 82.3%、塩化鉛(II)  $10\mu\text{M}$  で 28.9%であった。塩化鉛(II)  $0.5\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$  それぞれの曝露における、経皮内電気抵抗値は実験開始時それぞれ  $134.4\Omega\cdot\text{cm}^2$ 、 $134.4\Omega\cdot\text{cm}^2$ 、 $132.3\Omega\cdot\text{cm}^2$  から 6 時間後、 $83.0\Omega\cdot\text{cm}^2$ 、 $65.1\Omega\cdot\text{cm}^2$ 、 $52.5\Omega\cdot\text{cm}^2$  に低下した。それぞれの実験開始時の抵抗値に対する低下割合は 61.8%、48.4%、39.7%となった。

#### 2.5.4 *in vitro* 血液脳関門実験モデルにおける鉛透過速度測定実験結果

ICP-MS を用いた *in vitro* 血液脳関門実験モデルでの鉛透過量測定結果を図 2-10、2-11 に示す。

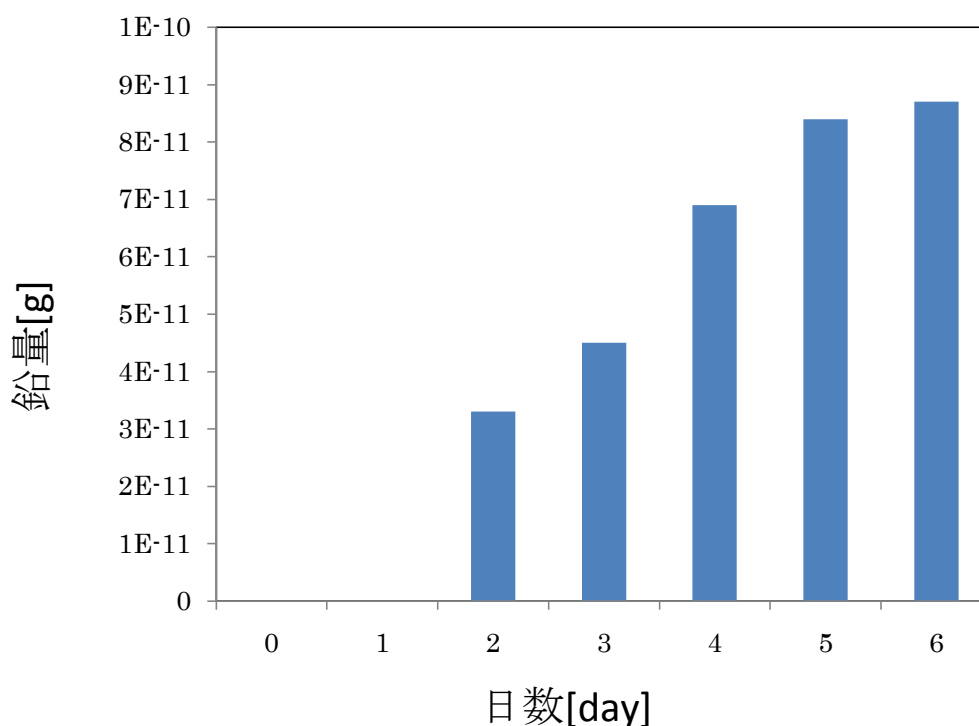


図 2-10. 酢酸鉛(II)三水和物  $1\mu\text{M}$  曝露における鉛透過量の経時変化

酢酸鉛(II)三水和物  $1\mu\text{M}$  曝露において図 3-1 から *in vitro* 血液脳関門実験モデルのメンブレン上に形成した微小血管内皮細胞層を透過した鉛量は日数によって増加し、その 5 日後を境に定常状態に達した。

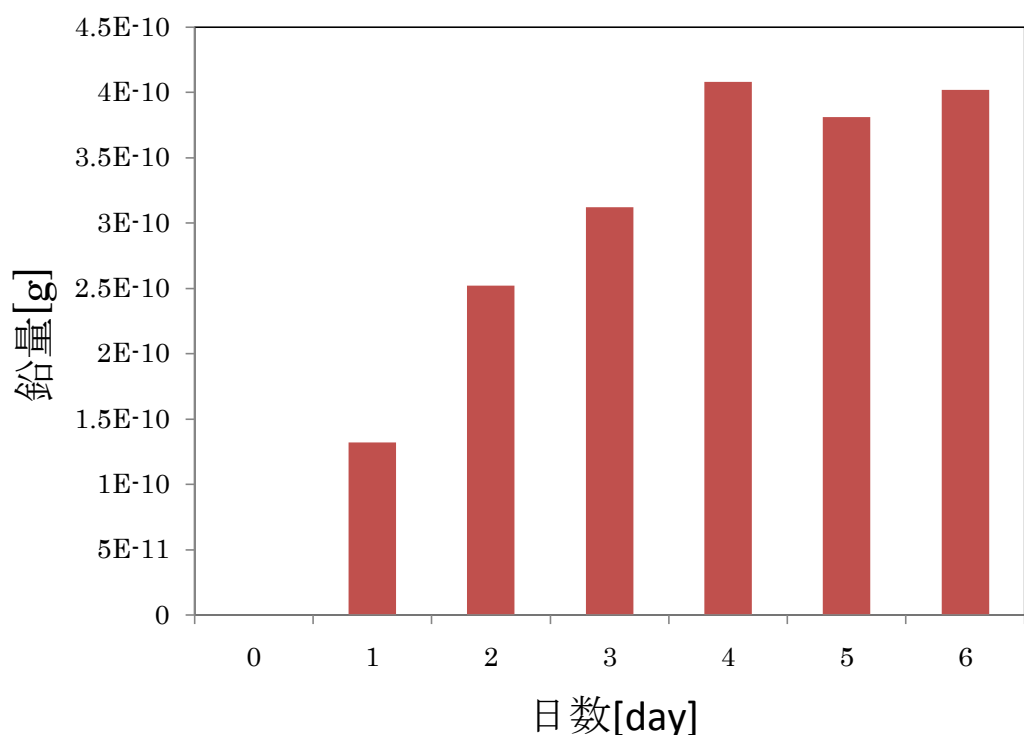


図 2-11. 酢酸鉛(II)三水和物 10 $\mu$ M 曝露における鉛透過量の経時変化

酢酸鉛(II)三水和物 10 $\mu$ M 曝露において *in vitro* 血液脳関門実験モデルのメンブレン上に形成した微小血管内皮細胞層を透過した鉛量は図 2-11 から日数によって増加を示したが、4 日目以降に定常状態になった。

以上の結果から、4 日目における酢酸鉛(II)三水和物濃度に対する鉛透過量を求め 1 日当たりの鉛透過量に直したグラフを、図 2-12 に示す。

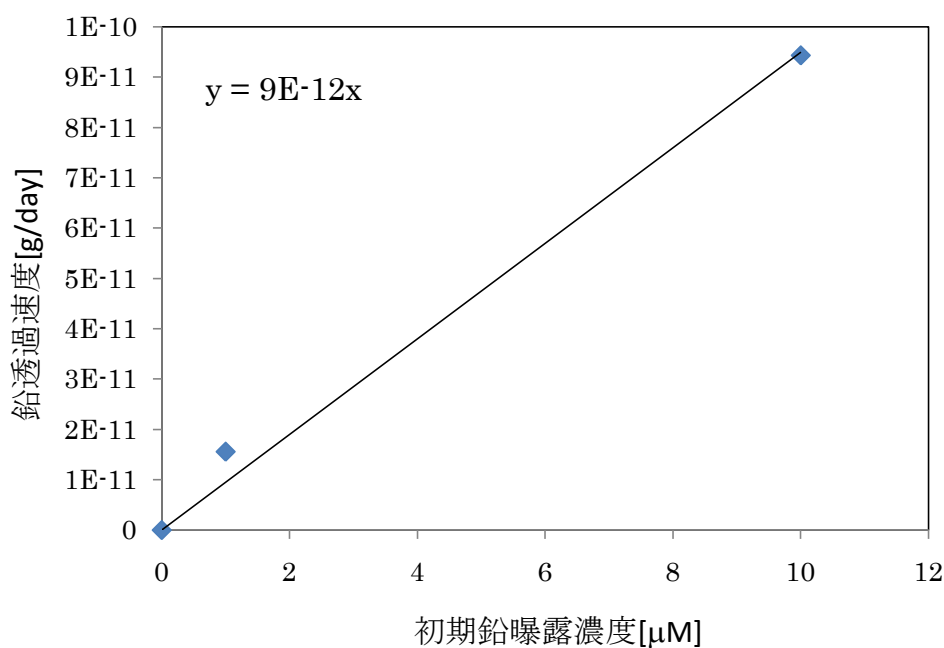


図 2-12. 酢酸鉛(II)三水和物曝露 4 日目における鉛透過濃度



図 2-12 から線形近似を行い、その近似式は  $y = 9E-12x$  となった。この近似式の傾きから鉛透過速度係数は  $9 \times 10^{-12}$  [g /day] となった。

## 2.6 考察

血液脳関門は脊椎動物の脳微小血管を形成する内皮細胞の位置で存在している(Kandel et al., 2000, Abbott et al., 2010)。血液脳関門は循環系と中枢神経系の間で物質の通過に干渉し、相対的に不浸透であるイオンや多くのアミノ酸、小分子のペプチド、タンパク質の取り込みを制限している。血液脳関門は脳の微小血管内皮細胞のタイトジャンクションと呼ばれる細胞間密着結合によって形成されている。このバリアーの生理的な機能は脳細胞の恒常性を保つことである。また経皮内電気抵抗は血液脳関門の完全性を示す有用な生体指標であり、生体内においては  $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$  を超えるものとなる(Crone et al., 1984)。本実験で用いた豚脳微小血管内皮細胞における *in vitro* 血液脳関門実験モデルはそれぞれ  $130 \Omega \cdot \text{cm}^2$  を超えるものとなり初代培養細胞を用いて計測された経皮内電気抵抗値の平均値  $120 \Omega \cdot \text{cm}^2$  を十分超えるものとなった。よって、本実験で用いた *in vitro* 血液脳関門実験モデルは十分使用できるものであるということが確認された。また、図 2-4 に示されるモデルにおける経皮内電気抵抗値の推移において 4 日目、5 日目においてその値がピークを迎えたが 6 日目において値が減少に転じた。経皮内電気抵抗値に影響を与える要素としてカルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )が報告されている(Hein et al., 1992, Erben et al., 1995, Gonzalez-Mariscal et al., 1985)。今回の測定においては 2 日ごとに培地交換を行ったが、豚脳微小血管内皮細胞がメンブレン上でコンフルエントに達し、経皮内電気抵抗値の増加が抑制され、培地内に含まれるカルシウムイオン消費による経皮内電気抵抗値低下の影響が表れたと考えられる。また、経皮内電気抵抗測定実験の際には培地を新たに交換し実験を開始したため、カルシウムイオン減少による経皮内電気抵抗値の低下は無視できるものと考えられる。

細胞の生存率を測定する主な方法としてはコロニー法、 $^3\text{H}$ チミジン取り込み法の他に MTT 法がある。この方法はテトラゾリウム塩化合物である MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide) を使用し、MTT が脱水素酵素の基質となる性質を利用している。MTT は細胞膜を透過後、ミトコンドリア内脱水素酵素によって青色の色素（ホルマザン: formazan）に還元され、生成したホルマザン量は生細胞数に対応する。本章で生存率試験に用いた Cell Counting Kit-8 は生細胞数を測定する方法として MTT 法を用い、テトラゾリウム塩として WST-8 を使用している。この基質によって生成するホルマザンは水溶性であるため、通常の MTT 法で行うホルマザンの溶解操作を必要としない。鉛化合物曝露による豚脳微小血管内皮細胞への毒性実験においてすべての鉛化合物  $100 \mu\text{M}$  の曝露で生存率に変化は見られなかった。よって、鉛化合物曝露における経皮内電気抵抗測定実験に使

用した最高濃度である 10 $\mu$ M においては豚脳微小血管内皮細胞に影響を及ぼすことがないことが確認された。

図 2-6 から図 2-8 に示されるように酢酸鉛(II)三水和物、硝酸鉛(II)、塩化鉛(II)それぞれの鉛化合物において時間、濃度依存的に経皮内電気抵抗値が減少することが示された。細胞単層の経皮内電気抵抗値とメンブレン上に形成される細胞単層内に存在するタイトジャンクションの数には相関関係がある(Gonzalez-Mariscal et al., 1985)。本実験において鉛化合物曝露によって経皮内電気抵抗値が減少を示したことは鉛化合物がセルカルチャーインサート上に形成した豚脳微小血管内皮細胞内のタイトジャンクションに影響を及ぼし、その細胞間密着結合を開放したことを示唆している。細胞間密着結合の開放は本来これによって制限されていた物質の取り込みが容易になり、物質が血液脳関門を透過しやすくなったことを示唆している。一方で経皮内電気抵抗値は移動するイオンの量によって決定されるため、鉛化合物曝露濃度が高くなるとそれによってセルカルチャーインサートに含まれるイオンの濃度が高くなるといった懸念がある。Table 2-1 に本実験で使用した CSC-Complete Medium の無機化合物組成を示す。CSC-Complete Medium は DMEM 培地と F-12 培地を 1 : 1 で混合させたものである。

Table 2-1. CSC-Complete Medium 組成（無機化合物）

Inorganic components	(mg/L)
CaCl <sub>2</sub> (anhyd.)	116.6
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0.0013
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> •9H <sub>2</sub> O	0.05
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.417
KCl	311.8
MgCl <sub>2</sub> (anhyd.)	28.64
MgSO <sub>4</sub> (anhyd.)	48.84
NaCl	6995.5
NaHCO <sub>3</sub>	1200
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (anhyd.)	54.34
NaHPO <sub>4</sub> (anhyd.)	71.02
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.432

本実験における鉛の最大濃度は  $10\mu\text{M}$  である。また、一番大きい分子量を持つ、酢酸鉛(II)三水和物の分子量は  $379.33$  である。以上のことから酢酸鉛(II)三水和物の添加量は  $3.7933\text{ mg/L}$  となる。これは培地に含まれる塩化ナトリウム( $\text{NaCl}$ )量と比較して  $1/1000$  以下である。よって、鉛化合物が添加されたことによるイオン濃度への影響はほとんどないと考えることができる。

また、それぞれの鉛化合物曝露濃度  $10\mu\text{M}$  における経皮内電気抵抗値を比較した図を図 2-13 に示す。

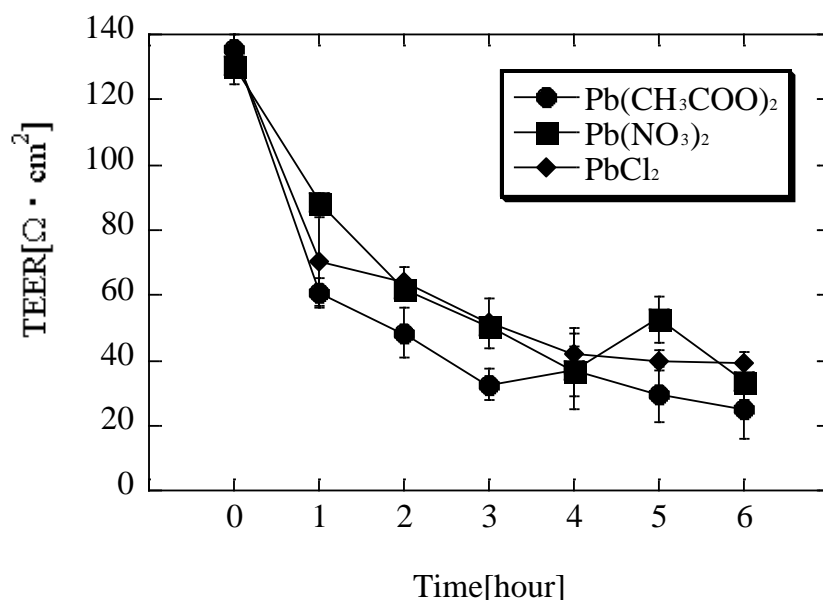


図 2-14. 各鉛化合物  $10\mu\text{M}$  曝露における経皮内電気抵抗値

この図から曝露時間 6 時間後での値を比較すると酢酸鉛(II)三水和物、硝酸鉛(II)、塩化鉛(II)でのどの鉛化合物においても経皮内電気抵抗値に大きな差はみられなかった。このことから鉛化合物の陰イオンの部分に関係なく鉛そのものが血液脳関門に影響を与えていることが示唆される。

鉛透過量を示すグラフ (図 2-10、図 2-11) から酢酸鉛(II)三水和物  $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$  それぞれの濃度において、*in vitro* 血液脳関門実験モデルのウェル側で鉛が観察された。鉛透過量測定実験において酢酸鉛(II)三水和物は微小血管を模しているインサート内に添加している。よって微小血管外を模しているウェル側に鉛が透過するためにはメンブレン上に形成した豚脳微小血管内皮細胞層を透過する必要がある。*in vitro* 血液脳関門実験モデルに対する酢酸鉛(II)三水和物曝露において経皮内電気抵抗値が減少することを述べた。経皮内電気抵抗値低下により微小血管内皮細胞のタイトジャンクション数が減少し、血液脳関門の機能が低下することが示唆されている。以上のことから鉛化合物が血液脳関門を透過して微小血管外へと移行し、脳内へ到達する可能性があることが示唆された。また、鉛透過速度係数は初期鉛濃度の値によらず一定であることが示された。こ

のことは *in vitro* 血液脳関門実験モデルにおいて、インサート側の鉛濃度に無関係に一定の割合でウェル側に鉛が透過することを示している。よって、脳の血管から脳への鉛の移行を交流する際、その分配係数は一定であることが示唆された。

## 参考文献

- Rubin LL, Staddon JM, The cell biology of the blood-brain barrier., 1999, Annu. Rev. Neurosci. , 22, p11-28.
- 中川慎介、丹羽正美, 血液脳関門(BBB), 2009, 日薬理誌, 133, p170-172.
- Boje KM, In vivo measurement of blood-brain barrier permeability., 2001, Current Protocols in Neuroscience, p7.19.1-7.19.39.
- Fraser PA, Dallas DA, Measurement of filtration coefficient in single cerebral microvessels of the frog., 1990, Journal of Physiology, 423, p343-361.
- Zlokovic BV, Begley DJ, Djuricic BM and Mitrovic DM, Measurement of solute transport across the blood-brain barrier in the perfused guinea pig brain: method and application to N-methyl-alpha-aminoisobutyric acid., 1986, J. Neurochem., 46(5), p1444-1451.
- Rapoport SI, Ohno K and Pettigrew KD, Blood-brain barrier permeability in senescent rats., 1979, Journal of Gerontology, 34(2), p162-169.
- Cecchelli R, Dehouck B, Descamps L, Fenart L, Buee-Scherrer V, Duhem C, Lundquist S, Rentfel M, Torpier G and Dehouck MP, In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier., 1999, Advanced Drug Delivery Reviews, 36, p165-178.
- Jeliazkova-Mecheva VV and Bobilya DJ., A porcine astrocyte/endothelial cell co-culture model of the blood-brain barrier., 2003, Brain Research Protocols, 12, p91-98.
- Raub TJ, Kuentzel SL and Sawada GA, "Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in vitro: barrier tightening by a factor released from astrogloma cells., 1992, Experimental Cell Research, 1992, p330-340.
- Lee H-S, Namkoong K, Kim D-H, Kim K-J, Cheong Y-H, Kim S-S, Lee W-B and Kim K-Y, Hydrogen peroxide-induced alterations of tight junction proteins in bovine brain microvascular endothelial cells., 2004, Microvascular Research, 68, p231-238.
- Ehrlich P, Das sauerstoffbedürfnis des organismus., 1885, Eine Farbenanalytische studie Hirschwald, Berlin.
- Ehrlich P, Ueber die beziehungen von chemischer constitution, verteilung und pharmakologischer wirkung., 1904, Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung, Hirschwald, Berlin, p.574.
- Goldman EE, Die äussere und innere sekretion des gesunden und kranken organismus im lichte der vitalen färbung., 1909, Beitr. Klin. Chir., 64, p192-265.

- Goldman EE, Vitalfarbung am zentralnervensystem., 1913, Abhandl. Konigl. Preuss. Akad. Wiss., 1, p1-60.
- Reese TS and Karnovsky MJ, Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase., 1967, J. Cell Biol., 34(1), p207-217.
- Clawson CC, Hartmann JF and Vernier RL, Electron microscopy of the effect of gram-negative endotoxin on the blood-brain barrier., 1966, J. Comp. Neurol. 127(2), p183-198.
- Donahue S, A relationship between fine structure and function of blood vessels in the central nervous system of rabbit fetuses., 1964, Am. J. Anat., 115, p17-26.
- Lampert P and Carpenter S, Electron microscopic studies on the vascular permeability and the mechanism of demyelination in experimental allergic encephalomyelitis., 1965, J. Neuropathol. Exp. Neurol., 24, p11-24.
- Rowland LP, Flink ME and Rubin LL, Cerebrospinal fluid: Blood brain barrier, brain oedema and hydrocephalus., 1992, In Principles of Neural Science, ed. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell T, New York: Elsevier, p1050-1060.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR and Bertino JR, Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 86(2), p695-698.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I and Willingham MC., Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: Evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein., 1989, J. Histochem. Cytochem., 37(2), p159-164.
- 馬場元毅, 絵で見る脳と神経 仕組みと障害のメカニズム第2版, 2007, 医学書院.
- Weiss N, Miller F, Cazaubon S and Couraud PO, The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases., 2009, Biochim. Biophys. Acta., 1788(4), p842-857.
- Butt AM, Jones HC, Abbott NJ. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study., 1990, J. Physiol., 429, p47-62.
- Virgintino D, Errede M, Robertson D, Capobianco C, Girolamo F, Vimercati A, Bertossi M and Roncali L., Immunolocalization of tight junction proteins in the adult and developing human brain., 2004, Histochem Cell Biol. 122(1), p51-59.

- Schinkel AH, P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier., 1999, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36, p179-194.
- Crone C. and Christensen O, Electrical resistance of a capillary endothelium., 1981, *J. gen. Physiol.*, 77, p349-371.
- Crone C, Frokjer-Jensen J, Friedman JJ and Christensen O, The permeability of single capillaries to potassium ions, 1978, *J. gen. Physiol.*, 71, p195-220.
- Crone C and Olsen SP, Electrical Resistance of Brain Microvascular Endothelium., 1982, *Brain Research*, 241, p49-55.
- Gonzalez-Mariscal L, Chávez de Ramírez B and Cereijido M, Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK)., 1985, *J. Membr. Biol.*, 86(2), p113-125.
- Cereijido M, Stefani E and Chávez de Ramírez B, Occluding junctions of the Necturus gallbladder., 1982, *J. Membr. Biol.*, 70(1), p15-25.
- Cecchelli R, Dehouck B, Descamps L, Fenart L, Buee-Scherrer VV, Duhem C, Lundquist S, Rentfel M, Torpier G and Dehouck MP, In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier., 1999, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 36, p165-178.
- Biernacki K, Antel JP, Blain M, Narayanan S, Arnold DL and Prat A, Interferon beta promotes nerve growth factor secretion early in the course of multiple sclerosis., 2005, *Arch. Neurol.*, 62, p563-568.
- Coisne C, Dehouck L, Faveeuw C, Delplace Y, Miller F, Landry C, Morissette C, Fenart L, Cecchelli R, Tremblay P and Dehouck B, Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium., 2005, *Lab. Invest.*, 85, p734-746.
- Meyer J, Mischeck U, Veyhl M, Henzel K and Galla HJ, Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells., 1990, *Brain Res.*, 514, p305-309.
- Perriere N, Yousif S, Cazaubon S, Chaverot N, Bourasset F, Cisternino S, Decleves X, Hori S, Terasaki T, Deli M, Scherrmann JM, Tamsamani J, Roux F and Couraud PO, A functional in vitro model of rat blood-brain barrier for molecular analysis of efflux transporters., 2007, *Brain Res.*, 1150, p1-13.
- Persidsky Y, Stins M, Way D, Witte MH, Weinand M, Kim KS, Bock P, Gendelman HE and Fiala M, A model for monocyte migration through the blood-brain barrier during HIV-1 encephalitis., 1997, *J. Immunol.*, 158, p3499-3510.

- Roux F, Durieu-Trautmann O, Chaverot N, Claire M, Mailly P, Bourre JM, Strosberg AD and Couraud PO, Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells., 1994, *J. Cell Physiol.*, 159, p101-113.
- Durieu-Trautmann O, Foignant-Chaverot N, Perdomo J, Gounon P, Strosberg AD and Couraud PO, Immortalization of brain capillary endothelial cells with maintenance of structural characteristics of the blood-brain barrier endothelium., 1991, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 27A, p771-778.
- Laschinger M and Engelhardt B, Interaction of alpha4-integrin with VCAM-1 is involved in adhesion of encephalitogenic T cell blasts to brain endothelium but not in their transendothelial migration in vitro., 2000, *J. Neuroimmunol.* 102, p32-43.
- Weksler BB, Subileau EA, Perriere N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA and Couraud PO, Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line., 2005, *FASEB J.* 19, p1872-1874.
- Bowman PD, Ennis SR, Rarey KE, Betz AL, Goldstein GW, Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: A model for study of blood-brain barrier permeability., 1983, *Ann. Neurol.*, 14(4), p396-402.
- Tewes B, Franke H, Hellwig S, Hoheisel D, Decker S, Griesche D, Tilling T, Wegener J and Galla HJ, IV.2. Preparation of endothelial cells in primary cultures obtained from the brains of 6-month-old pigs., 1997, *Drug Transport Across the Blood-Brain Barrier*, p91-97.
- Erben M, Decker S, Franke H and Galla HJ, Electrical resistance measurements on cerebral capillary endothelial cells—a new technique to study small surface areas., 1995, *J Biochem Biophys Methods.* 30(4), p227-238.
- Wegener J, Sieber M and Galla HJ, Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces., 1996, *J Biochem. Biophys. Methods.*, 32(3), p151-170.
- Kandel ER, Schwartz JH and Jessel TM, Principles of Neural Science, 4th Ed., 2000, McGraw-Hill, New York, p1294.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR and Begley DJ, Structure and function of the blood-brain barrier., 2010, *Neurobiol. Dis.*, 37(1), p13-25.



Crone C and Levitt DG, Handbook of physiology., 1984, Edited by Renkin EM and Michel CC, Am. Physiol. Soc. Bethesda, MD, p411-466.

Hein M, Madefessel C, Haag B, Teichmann K, Post A and Galla HJ, Implications of a non-lamellar lipid phase for the tight junction stability. Part II: Reversible modulation of transepithelial resistance in high and low resistance MDCK-cells by basic amino acids,  $\text{Ca}^{2+}$ , protamine and protons., 1992, Chem. Phys. Lipids., 63(3), p223-233.

### 第3章 鉛化合物曝露における神経細胞への毒性作用の検討

#### 3.1 はじめに

第2章において鉛が血液脳関門を開放させる作用をおよぼし、血液脳関門を鉛が透過することが確認された。鉛による神経系への作用機構として、鉛によって増幅される神経伝達物質の増加がある。Minnema らはラットの脳より作成したシナプトソームに酢酸鉛を曝露し、30 $\mu$ M 以下においてもドーパミン、アセチルコリン、 $\gamma$ アミノ酪酸の放出が増加したことを報告している (Minnema et al., 1986a, 1986b, 1988)。また、別の作用機構としては鉛がカルシウムと置き換わりカルシウムチャンネルを阻害することがある。神経細胞には電位依存性カルシウムチャンネルがあり、原形質膜から流入するカルシウムによって制御されている。Rius らはラットの脳内に鉛を曝露させ、カルシウムチャンネルの拮抗薬であるニトレンジピンの結合部位が増加したことを示し、鉛によって神経系でのカルシウムチャンネルの役割が妨害されていると報告した。(Rius et al., 1986)。

また鉛はカルシウムの代わりとしてプロテインキナーゼ C を活性化させることが報告されている (Markovac et al., 1988, Jadhav et al., 2000)。Markovac らは重金属におけるプロテインキナーゼ C 活性を測定し、鉛が活性を上昇させるとともに、ピコモルの鉛濃度におけるプロテインキナーゼ C 活性がマイクロモル濃度におけるカルシウムの活性と同様であったことを示した (Markovac et al., 1988)。プロテインキナーゼ C はカルシウムやリン脂質によって活性化される酵素で、細胞増殖や細胞分化、リン酸化の調節を行うといった機能を持つタンパク質であり (Nishizuka, 1986) 細胞間情報伝達にかかわっているとされている (Takai et al., 1979)。

また、鉛曝露の影響として神経細胞接着分子への影響がある。神経発生の過程において神経細胞接着分子は必要とされており、中枢神経系の構造形成に重要な役割を果たしていると考えられている (Edelman, 1986, Hoffman et al., 1983)。細胞接着分子のシアリル化状態を測定することで細胞間相互作用の状態を定性することができる (Hoffman et al., 1983, McCoy et al., 1985, Breen et al., 1987)。Breen らは Wistar ラットに塩化鉛を曝露し、神経細胞接着分子のシアリルトランスフェラーゼ活性を測定した結果、低濃度長期曝露の条件下で、シアリルトランスフェラーゼ活性が増加したことを示し、神経細胞接着分子の機能が鉛によって乱されると報告した。(Breen et al., 1988)

このように鉛による神経影響の作用機構としてはさまざまなものが報告されているものの、中枢神経系における鉛の作用機構として定義づけられる完全な説明はいまだなされていない (Toscano et al., 2005)。重金属や化学物質の健康リスク評価を行うに当たり、その物質が影響をおよぼす標的臓器、組織に対する容量反応関係を持つ毒性データが必要である。本研究では鉛の神経影響について着目しているため鉛の神経毒性を明らかにする必要がある。重金属や化学物質

の毒性を簡便に評価する方法として株化細胞を用いた生存率試験がある(日本組織培養学会(1991)。そこで本章では鉛化合物の神経毒性を明らかにすることを目的とする。

具体的には中枢神経系を構成する細胞である神経細胞、グリア細胞について説明し、ラット及びヒト由来のグリア細胞、神経細胞を用いた生存率試験を行い、鉛化合物曝露における神経細胞生存率の容量反応関係、鉛化合物の種類、細胞種、生物種といった点について着目し論じる。

### 3.2 神経細胞とグリア細胞

神経組織は体のある部位から他の部位への電氣的刺激を伝える役割を担っており、ヒトの神経組織の 95%は脳と脊髄に集中している。中枢神経を大きく分けると神経細胞とグリア細胞に分かれる。神経細胞の構造は核のある細胞体、細胞体から延び何本も枝分かれしている樹状突起と呼ばれる部分、軸索と呼ばれる一本の長い繊維状の部分の大きく 3 つからなっている。樹状突起は入力部分を受け取る部分となり、軸索は出力情報を伝える部分である。また、軸索の末端と新たな神経細胞との接合部の構造はシナプスと呼ばれる。神経細胞は人体で最も長い細胞であり、長いものでは 1m に達するものもある。しかし、ほとんどの神経細胞は分裂による増殖が不可能であり、損傷に対する自己修復能も極めて限られている。グリア細胞は神経膠細胞とも呼ばれ、中枢神経系ではアストロサイト(星状膠細胞)、オリゴデンドロサイト(希突起膠細胞)、ミクログリア(小膠細胞)、上衣細胞の 4 種類からなり、これらの細胞は大きさや形態、細胞突起などの特徴によって区分されている。グリア細胞は神経細胞の細胞体よりも小さく、分裂能を持つ。また、その数は全身で 1000 億個と言われる。4 種のグリア細胞の中でアストロサイトは血液脳関門の形成・維持にかかわっている。またそれ以外にも神経細胞の構造維持のための三次元的枠組みの構成、障害を受けた神経組織の修復、イオン・栄養素・ガス濃度調節による環境の整備、神経伝達物質の吸収・再利用といった役割を持っている。その他のグリア細胞の役割を簡単に述べると、オリゴデンドロサイトは中枢神経系の軸索を包み込むように存在し、その支持構造をなしている。ミクログリアは細胞の破片、代謝産物、病原体を貪食するといった清掃を行っている細胞である。上衣細胞は脳室と中心管の内面を覆っており、脳脊髄液の生産、循環、監視を助けている(F.H. マティーニら, 2003, 馬場, 2001, ゴードン M. シェパード, 1990, 境章, 2000, 佐野ら, 2005)。

### 3.3 ラット由来のグリア細胞 C6 細胞および神経細胞 PC12 細胞、ヒト由来グリア細胞

#### CCF-STTG1 および神経細胞 NT2/D1 細胞への鉛化合物毒性実験

#### 3.3.1 細胞

本実験で使用するラット由来グリア細胞の株化細胞である C6、ヒト由来グリア細胞

CCF-STTG1、ヒト由来神経細胞 NT2/D1 は大日本住友製薬株式会社より購入した。また、ラット由来神経細胞の株化細胞である PC12 は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。PC12 細胞は Falcon BIOCOAT Poly D-Lysine 100mm dish を用いて培養を行った。C6 細胞は 2.5% fetal bovine serum (FBS)、15% horse serum を含む Ham's F-10 培地、PC12 細胞は 5% FBS、10% horse serum を含む RPMI1640 培地、CCF-STTG1 細胞は 10% FBS、を含む RPMI1640 培地、NT2/D1 細胞は 10% FBS を含む Doulbecco's modified Eagle's Medium 培地 (DMEM) を使用し 37℃、CO<sub>2</sub> 濃度 5%、湿度 100% の条件下で培養を行った。

Falcon BIOCOAT Poly D-Lysine 100mm dish、発光測定用 96 穴プレートおよび発光測定用 Poly D-Lysine コーティング 96 穴プレートは日本ベクトンディッキンソン株式会社より購入した。セルカルチャーフラスコは IWAKI 社製のものを使用した。

### 3.3.2 試薬

本実験に使用した鉛化合物の酢酸鉛(II)三水和物、硫酸鉛(II)、塩化鉛(II)は和光純薬株式会社より購入した。それぞれの鉛化合物は滅菌した超純水に溶解し、0.2μm のフィルターを用いて濾過滅菌を行った後、最終濃度 10nM、100nM、1μM、10μM、100μM、1mM、3mM、10mM となるように調整し (塩化鉛(II)は 3mM まで)、生存率試験に使用した。Ham's F-10 培地、RPMI1640 培地および horse serum は Invitrogen 株式会社、FBS は MP Biomedicals 社より購入した。Trypsin-EDTA はナカライテスク株式会社より、PBS タブレットはタカラバイオ株式会社より購入した。生存率試験に用いる Cell Titer-Glo® Luminescent Cell Viability Assay は Promega 社より購入し、CellTiter-Glo™ Buffer を CellTiter-Glo™ Substrate に混合調整し、CellTiter-Glo™ Reagent として実験に使用した。

### 3.3.3 鉛化合物曝露によるラット由来グリア細胞 C6、神経細胞 PC12 およびヒト由来グリア細胞 CCF-STTG1、神経細胞 NT2/D1 細胞の生存率試験

C6 細胞、CCF-STTG1 細胞、NT2/D1 細胞は 75cm<sup>2</sup> 培養フラスコを用いそれぞれの培地でコンフルエントになるまで培養した。その後、トリプシンを用いて細胞をフラスコ底面より剥離した。185×g、10 分間の遠心分離にて細胞を回収後、それぞれの培地を用いて 2 × 10<sup>5</sup> cell/ml の濃度に再懸濁した。PC12 細胞は Falcon BIOCOAT Poly D-Lysine 100mm dish を用い RPMI1640 培地で培養を行った。コンフルエントに達した細胞をピペット先端でディッシュ底面より静かにかきとり、185×g、10 分間の遠心分離を行って細胞を回収した。回収した細胞は RPMI1640 培地で 2 × 10<sup>5</sup> cell/ml の濃度に調整した。

濃度調整をしたそれぞれの細胞懸濁液は発光測定用 96 穴プレートに 100μl (2 × 10<sup>5</sup>

cells/well) ずつ分注し、37℃、CO<sub>2</sub>濃度 5%、湿度 100%の条件下で 24 時間の前培養を行った。その後、各濃度の鉛化合物 10μl を各ウェル内の培地に添加し、37℃、CO<sub>2</sub>濃度 5%、湿度 100%の条件下で 48 時間の曝露処理を行った。

曝露処理後、96 穴プレート を 30 分間室温にて静置し、CellTiter-Glo™ Reagent 100μl を添加した。マイクロプレート用シェーカーで 2 分間攪拌を行い、細胞を溶解させた後、室温で 20 分間、プレートを静置した。ルミネッセンサーJNRⅡ AB-2300-R（アトー株式会社、東京）を用い、1 秒間の発光シグナルを測定し、その結果から、超純水のみを曝露した結果（コントロール）と比較して（3-1）式を用いそれぞれの細胞生存率を計算した。

$$\text{Cell Viability}(\%) = \frac{C_{\text{sample}} - C_{\text{blank}}}{C_{\text{control}} - C_{\text{blank}}} \times 100 \quad (3-1)$$

$C_{\text{blank}}$  : ブランクカウント数

$C_{\text{Control}}$  : コントロールカウント数,

$C_{\text{sample}}$  : サンプルカウント数

### 3.4 実験結果

ラット由来によるグリア細胞、神経細胞を用いた鉛化合物曝露における生存率試験の結果を図 3-1 から図 3-4 に示す。

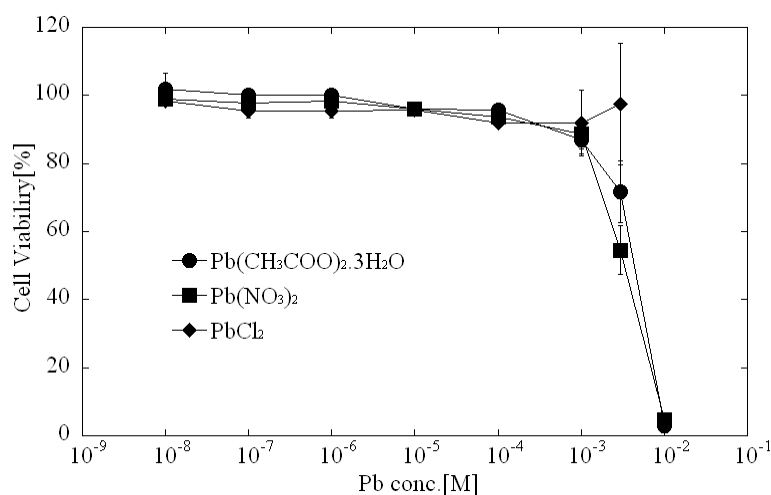


図 3-1. 鉛化合物曝露に対するラット由来グリア細胞 C6 の生存率

ラット由来グリア細胞 C6 の鉛化合物に対する生存率は 1mM までの濃度においてどの鉛化合物に対しても 80%以上の生存率を示した。3mM の濃度においては塩化鉛(II)において 97.5%の生

生存率を示したものの、酢酸鉛(II)三水和物では 71.8%、硝酸鉛(II)では 54.6%の生存率を示した。酢酸鉛(II)三水和物、硝酸鉛(II)10mM における生存率はそれぞれ 2.9%、4.7%であった。

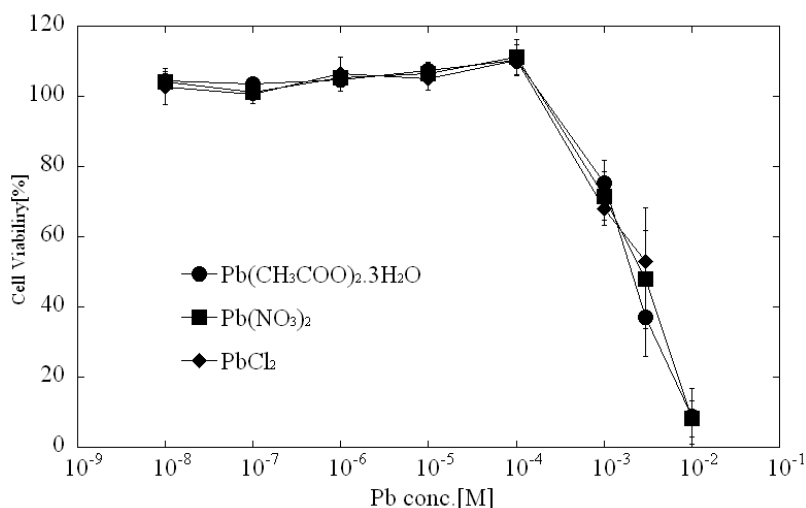


図 3-2. 鉛化合物曝露に対するラット由来神経細胞 PC12 の生存率

ラット由来神経細胞 PC12 の鉛化合物に対する生存率は 0.1mM までの濃度においてどの鉛化合物に対しても変化は見られなかった。3mM の濃度においての生存率はそれぞれの鉛化合物において、酢酸鉛(II)三水和物では 37.1%、硝酸鉛(II)では 47.9%、塩化鉛(II)では 52.9%に低下した。酢酸鉛(II)三水和物、硝酸鉛(II)10mM における生存率はそれぞれ 8.8%、8.2%であった。

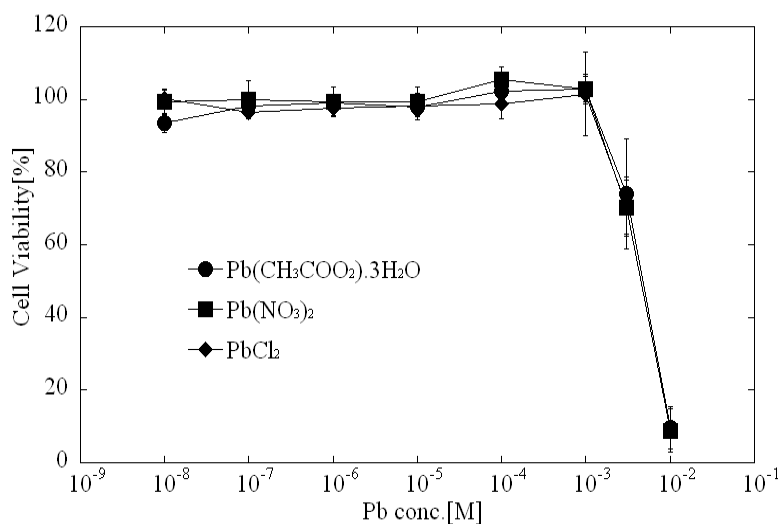


図 3-3. 鉛化合物曝露に対するヒト由来グリア細胞 CCF-STTG1 の生存率

ヒト由来グリア細胞 CCF-STTG1 の鉛化合物に対する生存率は 1mM までの濃度においてどの鉛化合物に対しても変化は見られなかった。3mM の濃度においての生存率はそれぞれの鉛化合物

物において 70%以上の生存率を示した。酢酸鉛(II)三水和物、硝酸鉛(II)10mM における生存率はそれぞれ 9.6%、8.9%であった。

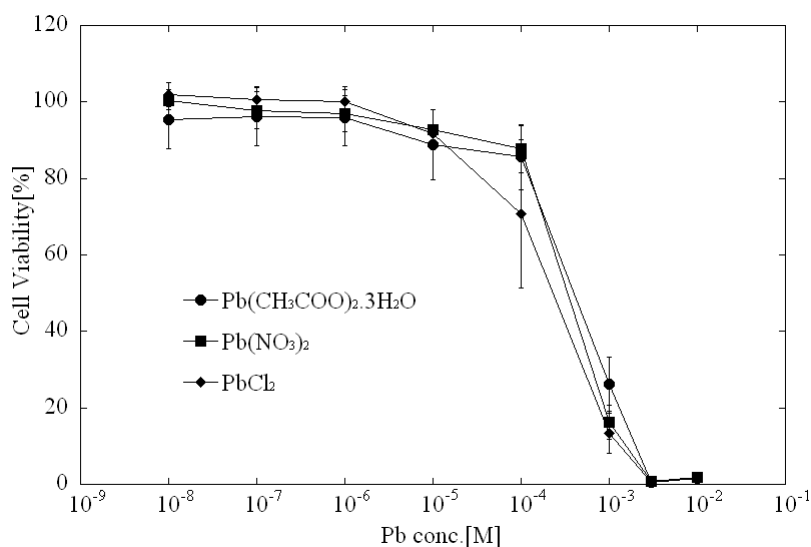


図 3-4. 鉛化合物曝露に対するヒト由来神経細胞 NT2/D1 の生存率

ヒト由来神経細胞 NT2/D1 の鉛化合物に対する生存率は 0.01mM までの濃度においてどの鉛化合物に対しても 80%以上の生存率を示した。1mM の濃度における生存率はそれぞれの鉛化合物において 30%以下に低下した。鉛化合物濃度 3mM における生存率は酢酸鉛(II)三水和物で 0.6%、硝酸鉛(II) で 0.8%、塩化鉛(II)で 0.6%であった。

また、鉛化合物における各種細胞の生存率を図 3-5 から図 3-7 に示す。

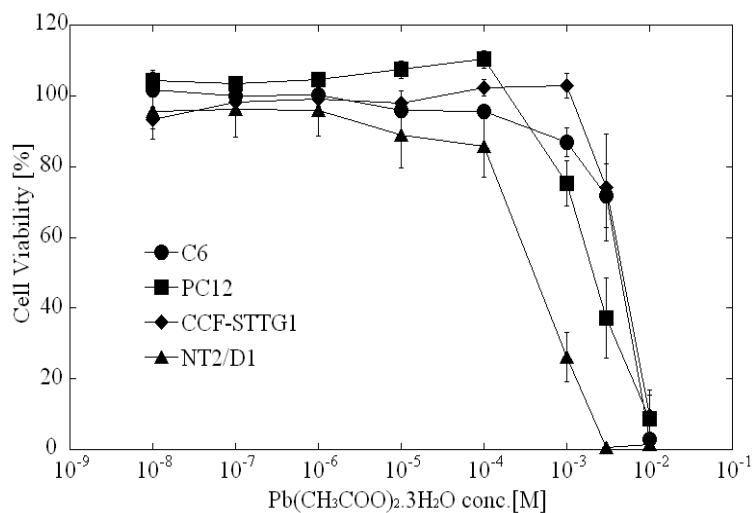


図 3-5. 酢酸鉛(II)三水和物曝露に対するラット由来グリア細胞 C6、神経細胞 PC12、ヒト由来グリア細胞 CCF-STTG1、神経細胞 NT2/D1 の生存率

酢酸鉛(II)三水和物に対するそれぞれの細胞の生存率は 0.1mM まではすべての細胞で 80%以上の生存率を示した。1mM においては C6 細胞、CCF-STTG1 細胞では 80%以上の生存率を示したが、PC12 細胞において 75.4%、NT2/D1 細胞においては 26.2%に生存率が低下した。3mM においては C6 細胞、CCF-STTG1 細胞では 71.8%、74.1%の生存率を示したが、PC12 細胞では 37.1%、NT2/D1 細胞では 0.6%に生存率が低下した。10mM の濃度においてはすべての細胞において生存率は 10%以下に低下した。

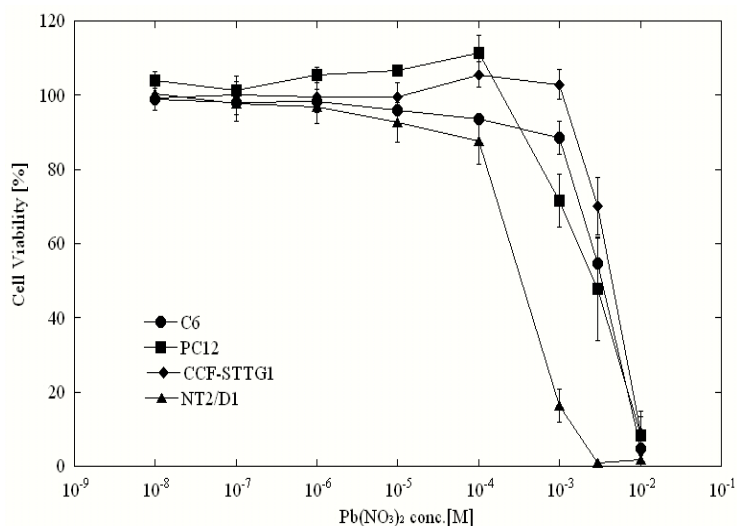


図 3-6. 硝酸鉛(II)に対するラット由来グリア細胞 C6、神経細胞 PC12、ヒト由来グリア細胞 CCF-STTG1、神経細胞 NT2/D1 の生存率

それぞれの細胞の硝酸鉛(II)曝露に対する生存率は 0.1mM まではすべての細胞において 80%以上の生存率を示した。1mM においては C6 細胞では 88.6%、CCF-STTG1 細胞では 102.9%と 80%以上の生存率を示したが、PC12 細胞では 71.6%、NT2/D1 では 16.3%に生存率が低下した。3mM においては C6 細胞で 54.6%、PC12 細胞で 47.9%、CCF-STTG1 細胞で 70.1%、NT2/D1 細胞で 0.8%にそれぞれ生存率が低下した。10mM 曝露においてはすべての細胞で 10%以下に生存率が低下した。



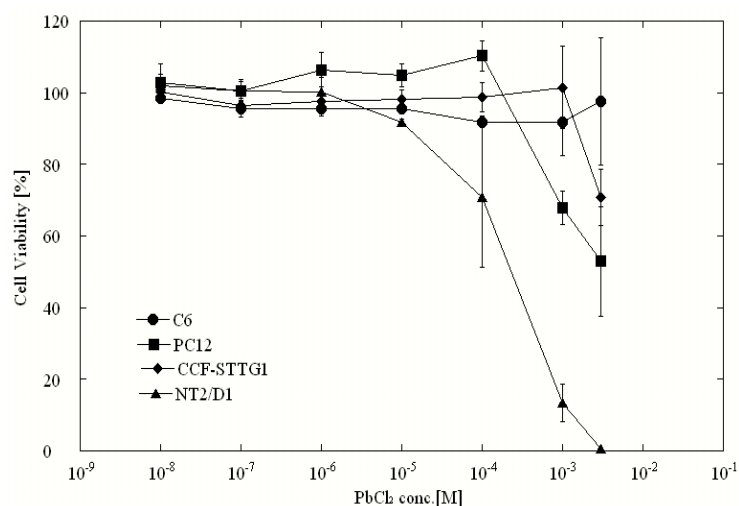


図 3-7. 塩化鉛(II)曝露に対するラット由来グリア細胞 C6、神経細胞 PC12、ヒト由来グリア細胞 CCF-STTG1、神経細胞 NT2/D1 の生存率

塩化鉛(II)の曝露に対する生存率は 0.01mM まではすべての細胞において 90%以上の生存率を示した。0.1mM においては C6 細胞、PC12 細胞、CCF-STTG1 細胞それぞれにおいて 90%以上の生存率を示したが、NT2/D1 細胞においては生存率が 70.8%に低下した。1mM においては C6 細胞、PC12 細胞では 90%以上の生存率を示したが、PC12 細胞では 67.9%、NT2/D1 細胞では 13.4%に生存率が低下した。3mM の曝露においては C6 細胞では 90%以上の生存率を示したが、PC12 細胞では 52.9%、CCF-STTG1 細胞では 52.9%、NT2/D1 細胞では 0.5%まで生存率が低下した。

### 3.5 考察

CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay Kit はルシフェラーゼ反応を用いた生細胞数測定キットである。発光を行うルシフェリン-ルシフェラーゼ反応に必要な要素に ATP を用い、CellTiter-Glo™ に含まれるルシフェラーゼ酵素は酸素、Mg<sup>2+</sup>、ATP の存在下で Beetle luciferin と反応し、Oxyluciferin を生成する。この反応の際、生じるエネルギーが発光の形で放出される。生じる発光量は細胞内代謝活性である ATP 存在量に比例するため、発光のカウント数を比較することで細胞の生存率を測定することができる。

ラット由来及びヒト由来グリア細胞と神経細胞それぞれの細胞に対し酢酸鉛(II)三水和物、硝酸鉛(II)、塩化鉛(II)を曝露した結果(図 3-1～図 3-4)、ラット由来グリア細胞 C6 に対する塩化鉛(II)曝露においては 3mM の濃度で鉛化合物に対する生存率に差が見られたもののその他の細胞においては曝露した鉛化合物の種類にかかわらずほぼ同様の生存率の低下傾向を示した。Bonacker らはハムスターの肺線維芽細胞である V79 細胞に対して酢酸鉛(II)、塩化鉛(II)を 0.1μM から

1000 $\mu$ M の範囲で 18 時間曝露し、ニュートラルレッド取り込み法を用いて生存率を測定したところ、それぞれの生存率曲線には差がないことを示している(Bonacker et al., 2005)。鉛化合物は水溶液中でイオンの状態で分かれるが酢酸鉛(II)は塩化鉛(II)、硝酸鉛(II)と比較して溶けやすいため、体内に吸収されやすいといわれている(Apostoli et al., 2000)。また、塩化鉛(II)が水溶液中で  $Pb^{2+}$  と  $Cl^-$  の形で存在しているのに対し、酢酸鉛(II)は水溶液中で  $[Pb_2(CH_3COO)_2]^{2+}$  や  $[Pb_2(CH_3COO)_3]^+$  の形態での陽イオンを生じさせる(Hofmann et al., 1996)。しかし、本研究においても Bonacker らと同様、鉛化合物の種類にかかわらず、同様の生存率曲線を示したことは、細胞毒性は鉛に結合する陰イオンや水溶液中での陽イオンの形態に影響を受けず、鉛濃度のみが影響を与えることを示唆している。

同一の鉛化合物を各種細胞に曝露したグラフ(図 4-5～図 4-7) からグリア細胞と神経細胞の生存率を比較すると、濃度 10 $\mu$ M までの生存率はすべての細胞において 80%以上を示し、生存率において差は見られなかったが 100 $\mu$ M において塩化鉛(II)ではヒト由来神経細胞 NT2/D1 の生存率が 80%を下回った。その後、1mM、3mM と濃度が増加するに従い、ヒト由来神経細胞 NT2/D1 の生存率はヒト由来グリア細胞 CCF-STTG1 の生存率を下回った。また、ラット由来神経細胞 PC12、ラット由来グリア細胞 C6 の生存率を比較すると同様の傾向が見られた。以上のことから、グリア細胞よりも神経細胞の方が鉛化合物に対する感受性が高く、毒性作用が強く表れることが示唆された。Emi らは Sprague-Dawley ラットの中脳より分離、培養した神経細胞とグリア細胞に活性酸素の一つである過酸化水素と神経毒性物質である 6-ヒドロキシドーパミンを曝露した結果、グリア細胞よりも神経細胞において生存率が低下していることを報告している(Emi et al., 1997)。これは、神経細胞とグリア細胞でフリーラジカル除去の能力に差があることが言われており(Makar et al., 1994)、酸化ストレスでの反応と同様に、血流不全や低酸素血症といった疾患が起こった時もグリア細胞よりも神経細胞の方がより障害を受ける(Siesjo, 1984)。神経細胞は脳への情報伝達、処理において非常に重要な役割を果たしているが、グリア細胞は神経細胞への必要物質の供給、シナプスで放出された神経伝達物質の除去、中枢神経系の維持や、環境の調節、損傷修復といった神経細胞の円滑な働きを保持するための役割を担っている(マティーニら, 2003)。このため、さまざまな物質にさらされるグリア細胞は化学物質に対する耐性が強いことが考えられ、神経細胞はグリア細胞よりも単独で存在することが困難であると考えられる。

また、1mM、3mM でのラット由来神経細胞 PC12、ヒト由来神経細胞 NT2/D1 の生存率を比較すると NT2/D1 細胞において鉛化合物に対する高い感受性が見られた。これは同じ神経細胞であっても鉛化合物に対する毒性影響が異なり、種差が見られることを示唆している。しかし、グリア細胞においては酢酸鉛(II)三水和物 3mM の濃度においてヒト、ラットそれぞれの由来の細胞腫において生存率に差が見られなかった。硝酸鉛(II)では 3mM の曝露においてラット由来グリア

細胞である C6 の方がヒト由来グリア細胞生存率 CCF-STTG1 よりも生存率が低く、塩化鉛 (II)3mM ではヒト由来グリア細胞 CCF-STTG1 の生存率の方がラット由来グリア細胞 C6 の生存率よりも低くなり、グリア細胞においてはそれぞれの鉛化合物で異なる感受性の差が見られた。

本章での実験結果から鉛に対する感受性が一番高かったヒト神経細胞 NT2/D1 における細胞死への影響を及ぼさない最大鉛濃度は図 3-4 から  $1 \times 10^{-6}$  [M] となった。この濃度を超えると細胞死の影響が表れると考えられこの値を神経毒性のエンドポイントの濃度としてリスク評価に使用する。

## 参考文献

- Minnema DJ, Greenland RD and Michaelson IA, Effect of in vitro inorganic lead on dopamine release from superfused rat striatal synaptosomes., 1986a, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 84(2), p400-411.
- Minnema DJ and Michaelson IA, Differential effects of inorganic lead and delta-aminolevulinic acid in vitro on synaptosomal gamma-aminobutyric acid release., 1986b, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 86(3), p437-447.
- Minnema DJ, Michaelson IA and Cooper GP, Calcium efflux and neurotransmitter release from rat hippocampal synaptosomes exposed to lead., 1988, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 92(3), p351-357.
- Rius RA, Govoni S and Trabucchi M, Regional modification of brain calcium antagonist binding after in vivo chronic lead exposure., 1986, *Toxicology*, 40(2), p191-197.
- Markovac J and Goldstein GW, Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C., 1988, *Nature*, 334(6177), p71-73.
- Jadhav AL, Ramesh GT and Gunasekar PG, Contribution of protein kinase C and glutamate in Pb(2+)-induced cytotoxicity., 2000, *Toxicol. Lett.*, 115(2), p89-98.
- Nishizuka Y, Studies and perspectives of protein kinase C., 1986, *Science*, 233(4761), p305-312.
- Takai Y, Kishimoto A, Iwasa Y, Kawahara Y, Mori T and Nishizuka Y, Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids., 1979, *J. Biol. Chem.*, 254(10), p3692-3695.
- Edelman GM, Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern., 1986, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 2, p81-116.
- Hoffman S and Edelman GM, Kinetics of homophilic binding by embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80(18), p5762-5766.
- McCoy RD, Vimr ER and Troy FA, CMP-NeuNAc:poly-alpha-2,8-sialosyl sialyltransferase and the biosynthesis of polysialosyl units in neural cell adhesion molecules., 1985, *J. Biol. Chem.*, 260(23), p12695-12699.
- Breen KC, Kelly PG and Regan CM, Postnatal D2-CAM/N-CAM sialylation state is controlled by a developmentally regulated Golgi sialyltransferase., 1987, *J. Neurochem.*, 48(5), p1486-1493.

- Breen KC and Regan CM, Lead stimulates Golgi sialyltransferase at times coincident with the embryonic to adult conversion of the neural cell adhesion molecule (N-CAM)., 1988, *Toxicology*, 49(1), 71-76.
- Toscano CD and Guilarte TR, Lead neurotoxicity: from exposure to molecular effects., 2005, *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 49(3), p529-54.
- F.H. マティーニ, M.J. ティモンズ, M.P. マッキンリ 著, 井上貴央 監訳, カラー人体解剖学 構造と機能: ミクロからマクロまで, 2003, 西村書店
- 馬場元毅, 絵で見る脳と神経 仕組みと障害のメカニズム第2版, 2001, 医学書院
- ゴードン M. シェパード 著, 山元大輔 訳, ニューロバイオロジー, 1990, 学会出版センター
- 境章, 新訂目で見るからだのメカニズム, 2000, 医学書院
- 佐野圭司, 高橋国太郎 監修, ネットー医学図譜 脳・神経系 I 構造と機能 学生版, 2005, 丸善
- 日本組織培養学会 編, 細胞トキシコロジー試験法, 1991, 朝倉書店
- Bonacker D, Stoiber T, Böhm KJ, Prots I, Wang M, Unger E, Thier R, Bolt HM and Degen GH, Genotoxicity of inorganic lead salts and disturbance of microtubule function., 2005, *Environ. Mol. Mutagen.*, 45(4), p346-53.
- Apostoli P, Huard C, Chaumontet C, Martel P, Alessio L and Mazzoleni G, Effects of four inorganic lead compounds on the proliferation and junctional coupling of cultured REL liver cells., 2000, *Am. J. Ind. Med.*, 38(3), p340-348.
- Hoffmann U and Rüdorf W, *Anorganische chemie*. 19 Auflage. Braunschweig: Friedr., 1966, Vieweg und Sohn., p541.
- Iwata E, Asanuma M, Nishibayashi S, Kondo Y and Ogawa N, Different effects of oxidative stress on activation of transcription factors in primary cultured rat neuronal and glial cells., 1997, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 50(1-2), p213-220.
- Makar TK, Nedergaard M, Preuss A, Gelbard AS, Perumal AS and Cooper AJ, Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain., 1994, *J. Neurochem.*, 62(1), p45-53.
- Siesjo BK, Cerebral circulation and metabolism., 1984, *J. Neurosurg.*, 60, p883-908.

## 第4章 鉛の神経影響を考慮したヒト健康リスク評価

### 4.1 はじめに

第2章、第3章にかけて鉛の神経毒性を血液脳関門に着目し、*in vitro* 血液脳関門実験モデルを用いた経皮内電気抵抗測定実験、鉛透過量測定実験、そしてラット、ヒト由来グリア細胞、神経細胞を用いた神経毒性試験を行い、鉛の神経毒性に関して新たな知見を得た。本章では新たな知見をもとに従来の鉛に対するヒト健康リスク評価モデルの再構築を行い、そのモデルを用いて健康リスク評価シミュレーションを行うことを目的とする。

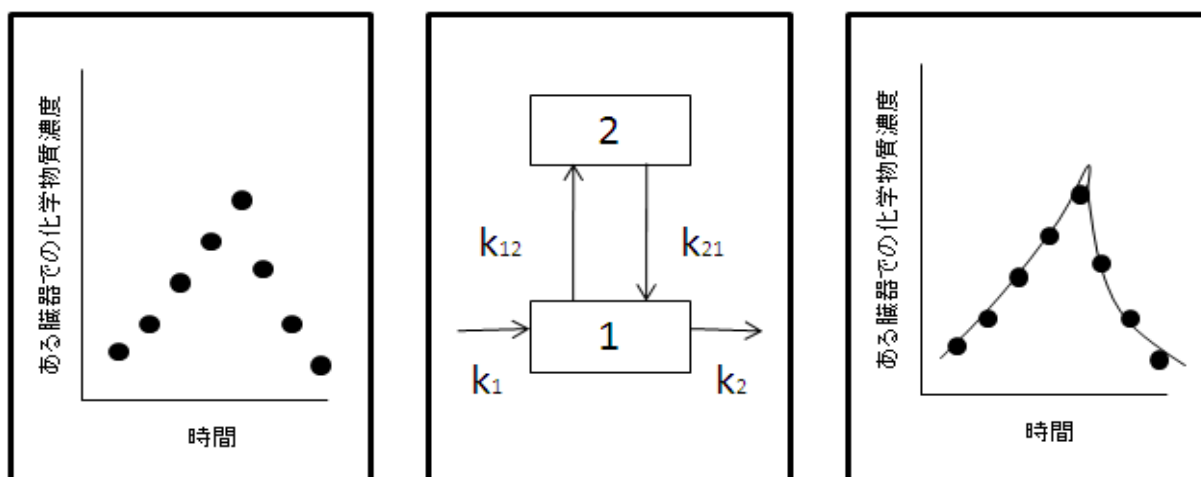
具体的には本章で用いるモデルである PBPK モデルについて説明し、従来のモデルについて述べる。その後、脳のコンパートメントを追加した新たな PBPK モデルを再構築し、新たな健康リスク評価シミュレーションを行い、その有効性について検討する。

### 4.2 PBPK モデルについて

多くの化学物質の毒性研究においてその目的は動物実験でのデータや *in vitro* 試験でのデータをもとにヒトの健康リスクを評価することである。その際、問題となるのは実験動物では化学物質の濃度が高いことや曝露の形態が注射による投与などといった通常では起こることはほとんどない条件であるということである。よって、動物実験のデータからヒトへ適応する外挿を行うに当たり、以下の4点に対する注意が必要とされている(Andersen, 2003)。

- 1.: 化学物質の濃度が低い場合における容量反応関係
- 2.: 実験動物とヒトの種差
- 3.: ヒトの日常生活での適切な曝露経路
- 4.: 実験のような決まった条件での曝露ではなく曝露条件が不確定であること

異なる動物種の間でさまざまな曝露条件下における臓器中化学物質の濃度予測の信頼性を上げることが、実験動物からヒトへの外挿の成功を担うこととなる。この目的を達成する一つのツールとして薬動力学モデル(Pharmacokinetic Model; PK モデル)が用いられるようになった。毒性物質に対する初期の PK モデル構築は、化学物質濃度の経時変化測定をさまざまな臓器、さまざまな化学物質濃度に対して行うことで得られたデータに基づいてコンパートメントモデルを構築する。そして、得られたデータに合うようにパラメーターを調節する。PK モデル構築の流れを図4-1に示す。しかし、この方法はモデルのパラメータに解剖学、生理学、生物学といったことを考慮していないため、モデルを用いて得られたデータも実測値の間を補足しているにすぎない。よって、PK モデルは低濃度での動物からヒトへの外挿が必要とされるリスクアセスメントの分野では適切ではない(Andersen, 2003)。



データ収集 → モデル構築 → データへのフィッティング

図 4-1. PK モデルの構築 (Andersen, 2003)

この問題点を改善するために PK モデルを下地として、生理学的薬動力学モデル (Physiologically Based Pharmacokinetic Model : PBPK モデル)が開発された。PBPK モデルでは各コンパートメントは個々の臓器、もしくはひとまとまりにしても不都合がない臓器のグループによって構成され、血流速度、化学物質の代謝経路といったものでそれぞれがつながれている (Andersen, 1991, Bischoff et al., 1966)。さらに PK モデルでは考慮されていなかった化学物質の代謝に対する生物学的、生化学的定数、各臓器での分配係数といったパラメータが PBPK モデルではそれぞれのコンパートメント臓器に組み入れられており、化学物質の体内動態を定量的に把握するため、それぞれの生物学的パラメータ、各コンパートメント間の物質収支を数学的記述を用いて表している (Krishnan et al.(1994))。そして設計したモデル、得られたパラメータからシミュレーションを行い、その結果からさらなるモデルの改良を行うことで、完成度を高めていくことが可能である (Andersen, 2003)。

PBPK モデルはさまざまな化学物質のリスクアセスメントに使用されており (Andersen et al., 1987, Clewell et al., 1987, Gerlowski et al., 1983, Himmelstein et al., 1979, Leung, 1991, National Research Council, 1986)、主に、化学物質の移行経路、服用量、投与回数などを考慮し、標的臓器への分布蓄積を計算することで、その潜在的な濃度を予測できるとされている (Clewell et al., 1985)。また、化学物質の動物実験データに基づき、ヒトに対する外挿を行い、ヒトへの曝露濃度の安全値を求めるリスクアセスメントも行われるようになった (Andersen et al., 1994)。図 4-2 に PBPK モデル構築の流れ、図 4-3 に Krishnan らによって示された PBPK モデルの一般的な概念図を示す。

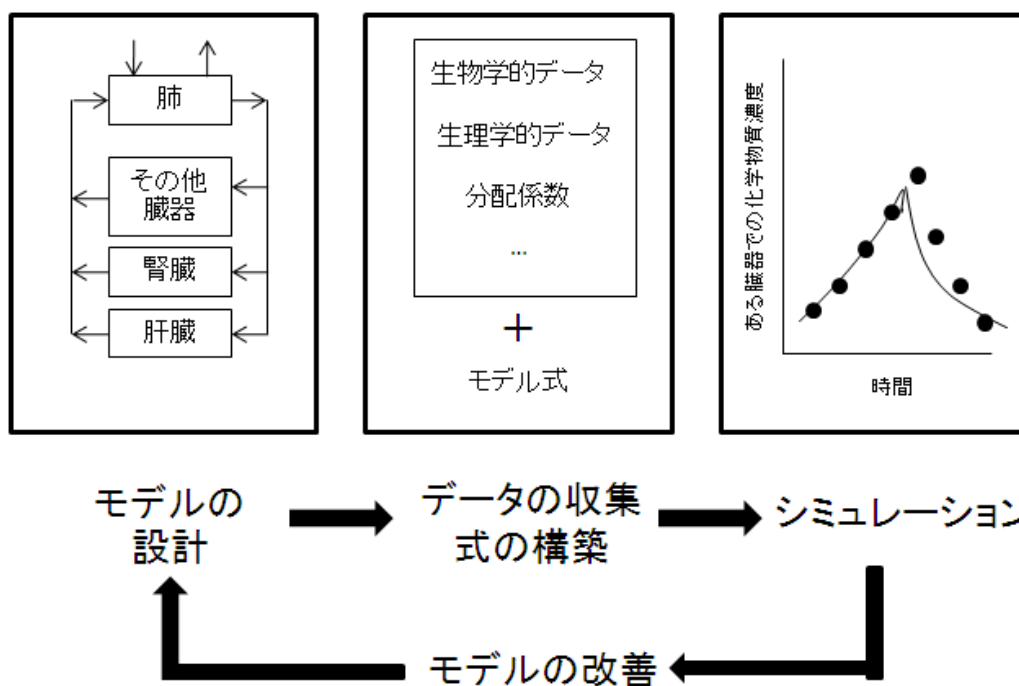


図 4-2. PBPK モデルの構築 (Andersen, 2003)

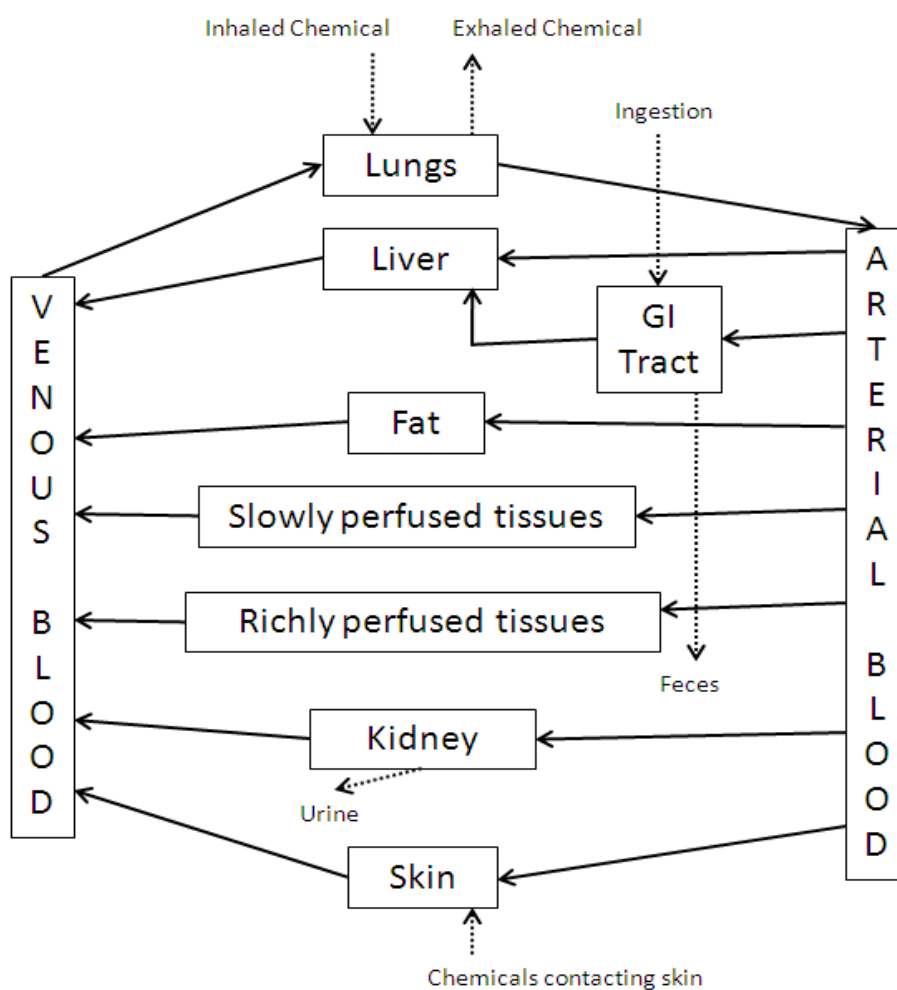


図 4-3. 化学物質曝露に対する PBPK モデルの概念図(Krishnan et al., 1994)



### 4.3 鉛における PBPK モデル

PBPK モデルはさまざまな化学物質、重金属に対して適応され、鉛に対してもモデルが提唱、改良されてきた。

初期に提唱された鉛に対する PBPK モデルの一つに Rabinowitz らが提唱したモデルがある (Rabinowitz et.al., 1976)。その後、Marcus らは Rabinowitz らのデータを用いて再分析を行い、複数のコンパートメントで形成される動態モデルを提唱した (Marcus, 1985a, 1985b, 1985c)。

O'Flaherty は鉛の PBPK モデルに関する研究、開発を行い、図 4-4 の PBPK モデルを示した (O'Flaherty, 1991a, 1991b, 1991c, 1993, 1995)。

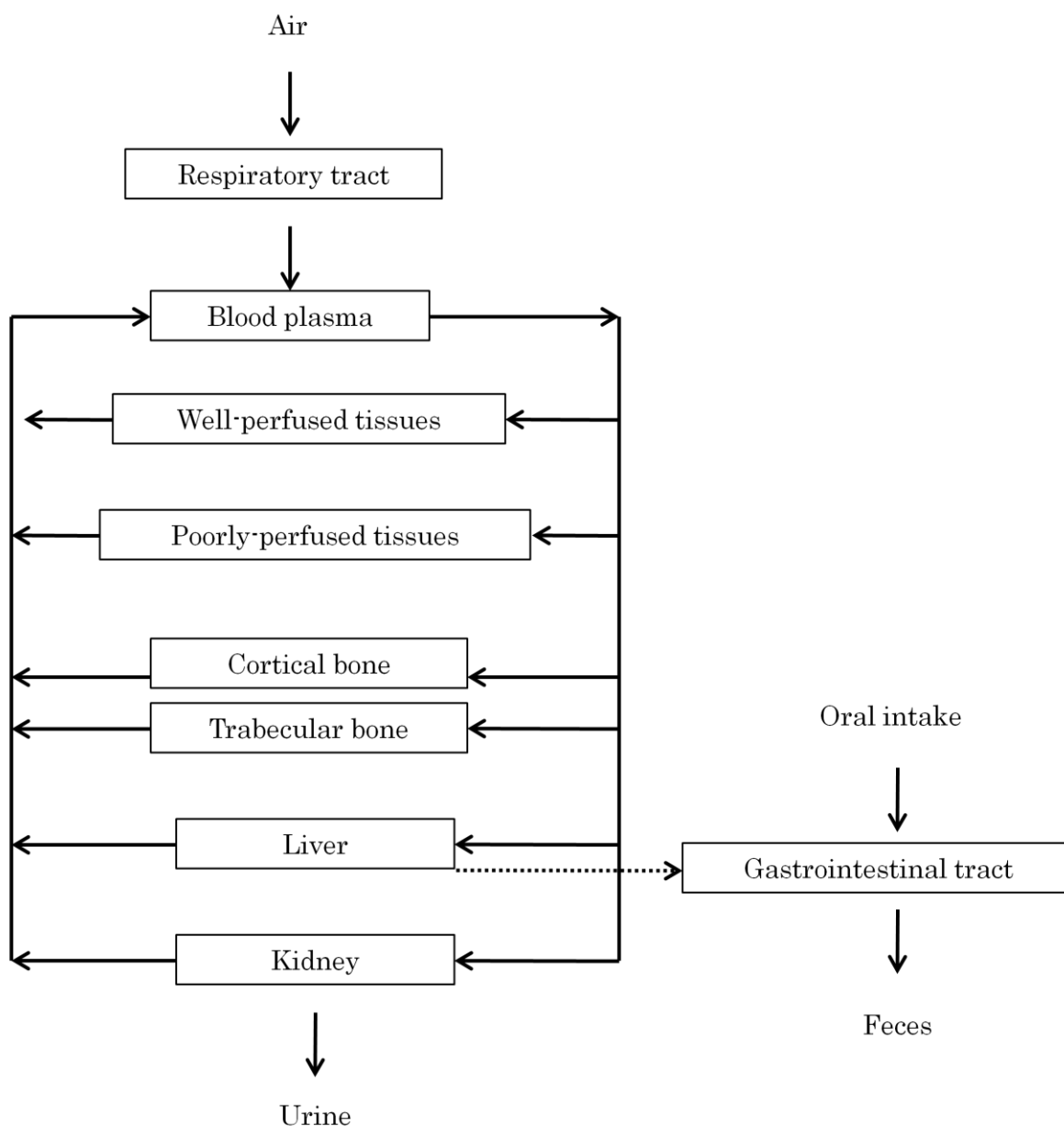


図 4-4. O'Flaherty による鉛の PBPK モデル (O'Flaherty, 1991c, 1993, 1995)

このモデルでは体内を血漿（肺）、肝臓、腎臓、骨、良浸透組織群、貧浸透組織群の 6 つのコンパートメントに分類し、それぞれのコンパートメントは血流によって結ばれている。日高は O'Flaherty モデルを元に、鉛に関する PBPK モデルを再構築した。O'Flaherty モデルでは鉛の骨蓄積性に着目し、骨中での鉛の動態を詳細に解析するために骨のコンパートメントを皮質骨、骨梁へと分けていたが鉛の体内動態を求める場合においてコンパートメントを分ける必要がないと判断し、単一のコンパートメントに統一した。日高が提唱した PBPK モデルを図 4-5 に示す。日高はこのモデルを用い、シミュレーションを行い、良好な結果が得られたことからこのモデルが妥当であると結論付けた。

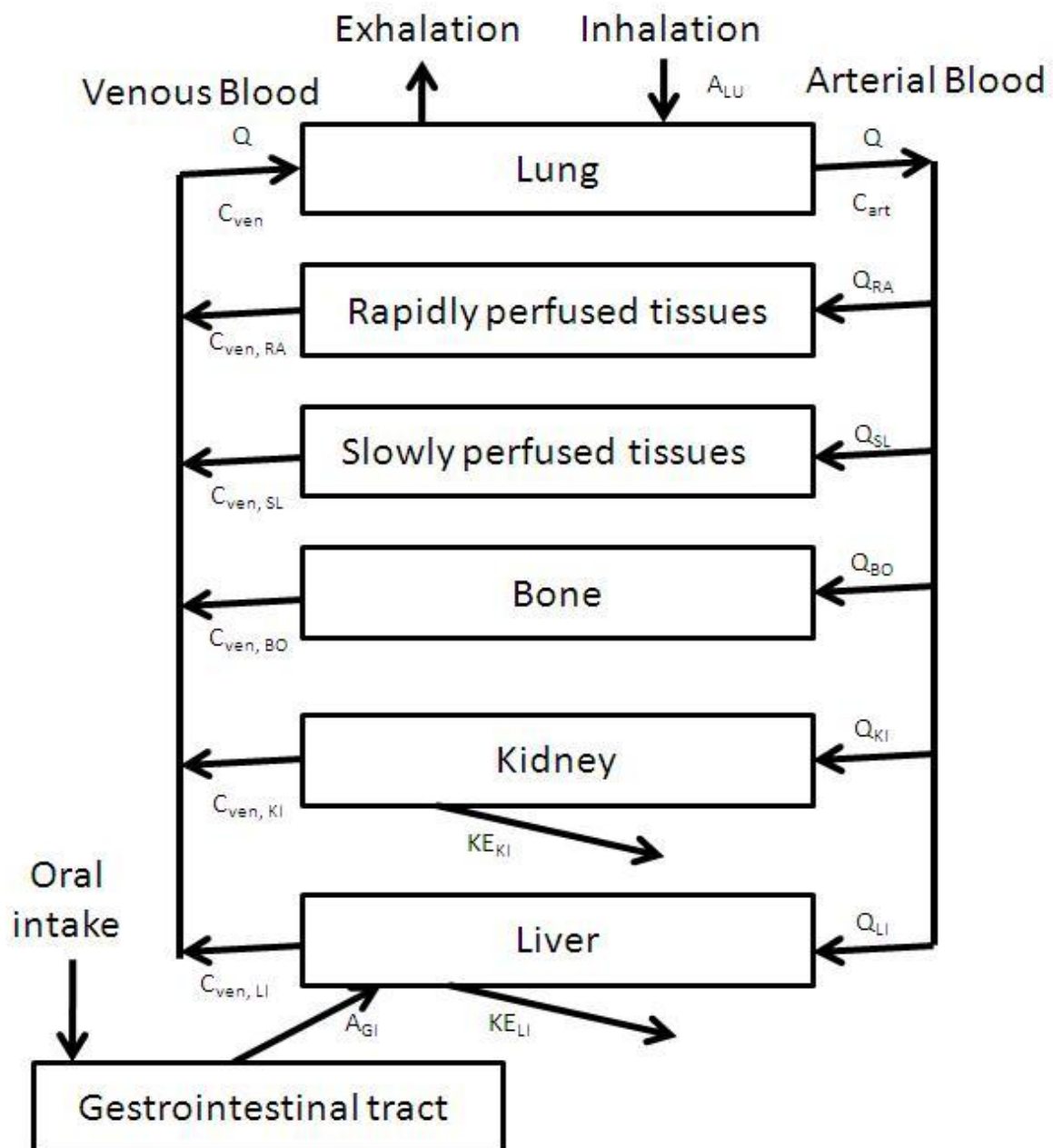
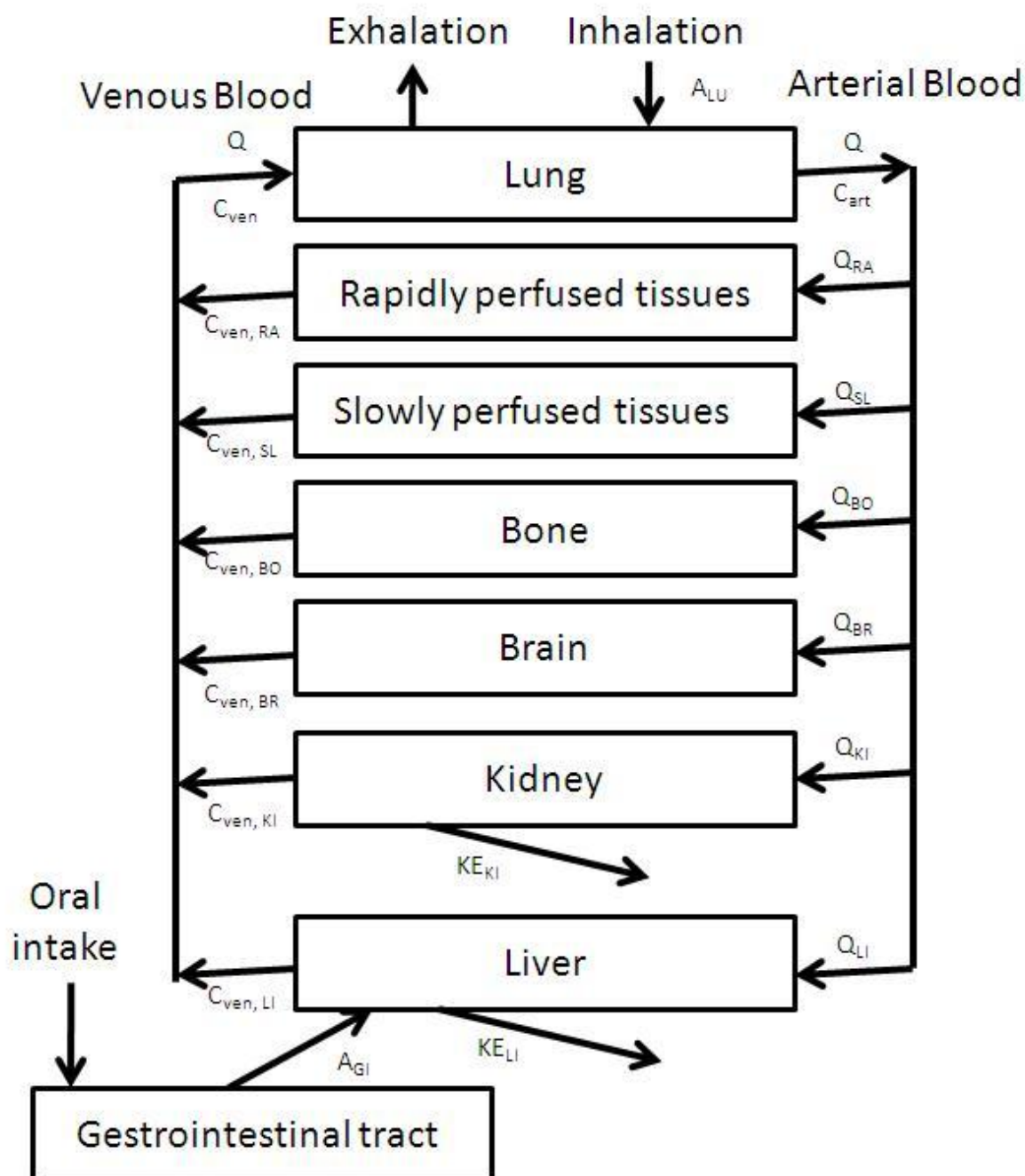


図 4-5. 日高らによる鉛の PBPK モデル（日高, 1999）

#### 4.4 鉛曝露によるヒト健康評価モデルの再構築

本章では神経影響に着目した鉛曝露によるヒト健康評価モデルを構築するために、従来のモデルの改良を行う。神経影響を生じるには脳への移行が必要となるため日高の PBPK モデルに脳のコンパートメントを追加したモデルを構築する。図 4-6 にモデル図、表 4-1 にそれぞれのパラメータを示す。なお、脳-血漿間分配係数は良浸透臓器・組織群と血漿との分配係数である 100 を暫定的に使用した。



$$\text{肝臓} : V_{LI} \frac{dC_{LI}}{dt} = Q_{LI}(C_{art} - C_{ven,LI}) + A_{GI} \cdot D_{oral} - KE_{LI} \cdot C_{LI} \cdot V_{LI} \quad (4-1)$$

$$\text{腎臓} : V_{KI} \frac{dC_{KI}}{dt} = Q_{KI}(C_{art} - C_{ven,KI}) - KE_{KI} \cdot C_{KI} \cdot V_{KI} \quad (4-2)$$

$$\text{良浸透臓器群} : V_{RA} \frac{dC_{RA}}{dt} = Q_{RA}(C_{art} - C_{ven,RA}) \quad (4-3)$$

$$\text{貧浸透臓器群} : V_{SL} \frac{dC_{SL}}{dt} = Q_{SL}(C_{art} - C_{ven,SL}) \quad (4-4)$$

$$\text{骨} : V_{BO} \frac{dC_{BO}}{dt} = Q_{BO}(C_{art} - C_{ven,BO}) \quad (4-5)$$

$$\text{脳} : V_{BR} \frac{dC_{BR}}{dt} = Q_{BR}(C_{art} - C_{ven,BR}) \quad (4-6)$$

$$C_{p_{ven,i}} = \frac{C_i}{P_i} \quad (4-7)$$

$$C_{ven,i} = 0.55C_{p_{ven,i}} + 0.45C_{p_{ven,i}} \left( 1 + \frac{BIND}{KBIND + C_{p_{ven,i}}} \right) \quad (4-8)$$

$$C_{ven} = \frac{1}{Q} (Q_{LI} \cdot C_{ven,LI} + Q_{KI} \cdot C_{ven,KI} + Q_{RA} \cdot C_{ven,RA} + Q_{SL} \cdot C_{ven,SL} + Q_{BO} \cdot C_{ven,BO} + Q_{BR} \cdot C_{ven,BR}) \quad (4-9)$$

$$C_{art} = \frac{Q \cdot C_{ven} + A_{LU} \cdot Q_{alv} \cdot C_{inh}}{Q} \quad (4-10)$$

$V_i$  : 臓器・組織  $i$  の体積[L]

$Q_i$  : 臓器・組織  $i$  へ流入する血液流量[L/day]

$C_i$  : 臓器・組織  $i$  中鉛濃度[mg/L]

$C_{art}$  : 動脈血中鉛濃度[mg/L]

$C_{ven,i}$  : 臓器・組織  $i$  から流出する静脈血中鉛濃度[mg/L]

$C_{p_{ven,i}}$  : 組織  $i$  から流出する静脈血の血漿中鉛濃度[mg/L]

$P_i$  : 組織  $i$  と血漿間の鉛分配率[-]

$BIND, KBIND$  : 血液中鉛と血漿中鉛の存在量に関する定数[mg/L]

$AGI, A_{LU}$  : 消化器官、肺からの鉛吸収率[-]

$KE_i$  : 臓器・組織  $i$  におけるクリアランス速度定数[L/day]

図 4-6. 本研究で用いる鉛における PBPK モデルおよび基礎方程式

表 4-1. 本研究で用いる PBPK モデルにおける基礎パラメータ

パラメータ	記号	値	単位
体重	BW	(条件によって変更)	kg
臓器・組織の体積			
肝臓*	$V_{LI}$	$0.04 \times BW^{0.85}$	L
腎臓*	$V_{KI}$	$0.0085 \times BW^{0.84}$	L

良浸透臓器・組織群*	$V_{RA}$	$0.10 \times BW^{0.85} - V_{LI} - V_{KI} - V_{BR}$	L
貧浸透臓器・組織群*	$V_{SL}$	$BW - V_{LI} - V_{KI} - V_{RA} - V_{BO}$	L
骨*	$V_{BO}$	$0.039 \times BW^{1.02}$	L
脳**	$V_{BR}$	$0.02 \times BW$	L
血流量			
総血液量*	Q	$340 \times BW^{0.74}$	L/day
肺胞換気量*	$Q_A$	$1.01 \times Q$	L/day
総血流量に占める割合			
肝臓*	$Q_{LI}$	0.25	-
腎臓*	$Q_{KI}$	0.17	-
良浸透臓器・組織群*	$Q_{RA}$	0.32	-
貧浸透臓器・組織群*	$Q_{SL}$	0.09	-
骨*	$Q_{BO}$	0.05	-
脳**	$Q_{BR}$	0.12	-
臓器・組織-血漿間分配係数			
肝臓/血漿*	$P_{LI}$	100	-
腎臓/血漿*	$P_{KI}$	100	-
良浸透臓器・組織群/血漿*	$P_{RA}$	100	-
貧浸透臓器・組織群/血漿*	$P_{SL}$	20	-
骨/血漿*	$P_{BO}$	1000	-
脳/血漿***	$P_{BR}$	100	-
クリアランス速度係数			
肝臓からのクリアランス****	$KE_{LI}$	0.2	1/day
腎臓からのクリアランス****	$KE_{KI}$	0.47	1/day
吸収率			
腸管からの吸収*	$A_{GI}$	0.11	-
呼吸器からの吸収*	$A_{LU}$	0.5	-
血液内での分配			
BIND*	BIND	2.7	mg/L
KBIND*	KBIND	0.0075	mg/L

\* O'Flaherty, 1993

\*\*Brown et. al., 1997

\*\*\*易浸透臓器・組織群と同様に暫定的に決定

\*\*\*\*日高, 1999

#### 4.5 再構築したヒト健康リスク評価モデルによる健康リスク評価シミュレーション

##### 4.5.1 脳コンパートメントモデルを追加した PBPK モデルの検証

日高が構築した PBPK モデルに脳のコンパートメントを追加した新たなモデルを用いて Rabinowitz ら(Rabinowitz et.al., 1976)の研究データをもとに行ったシミュレーション結果と実測値との比較を、図 4-7~4-10 に示す。Rabinowitz らのトレーサー実験で行われた各被験体の実験データは表 4-3 のとおりである。

表 4-3. Rabinowitz らのトレーサー実験条件

	対象			
	A	B	C	D
年齢[歳]	53	49	25	26
体重[kg]	70	89	58	84
曝露量[ $\mu\text{g}/\text{日}$ ]	204	185	105	99
曝露期間[日]	1~104	1~124	1~83	1~8 42~52

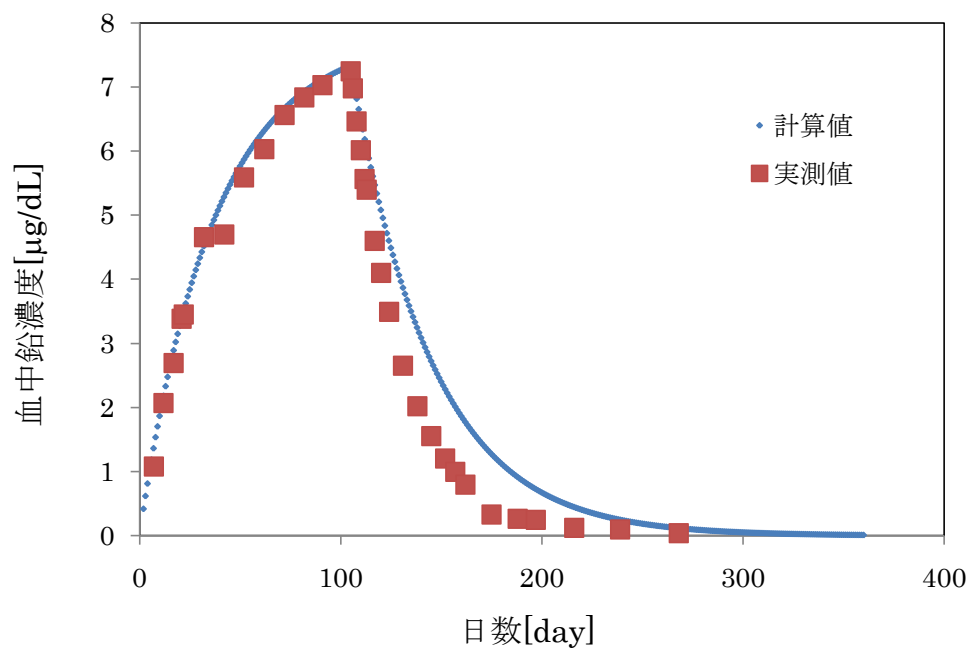


図 4-7. 対象 A のシミュレーション結果

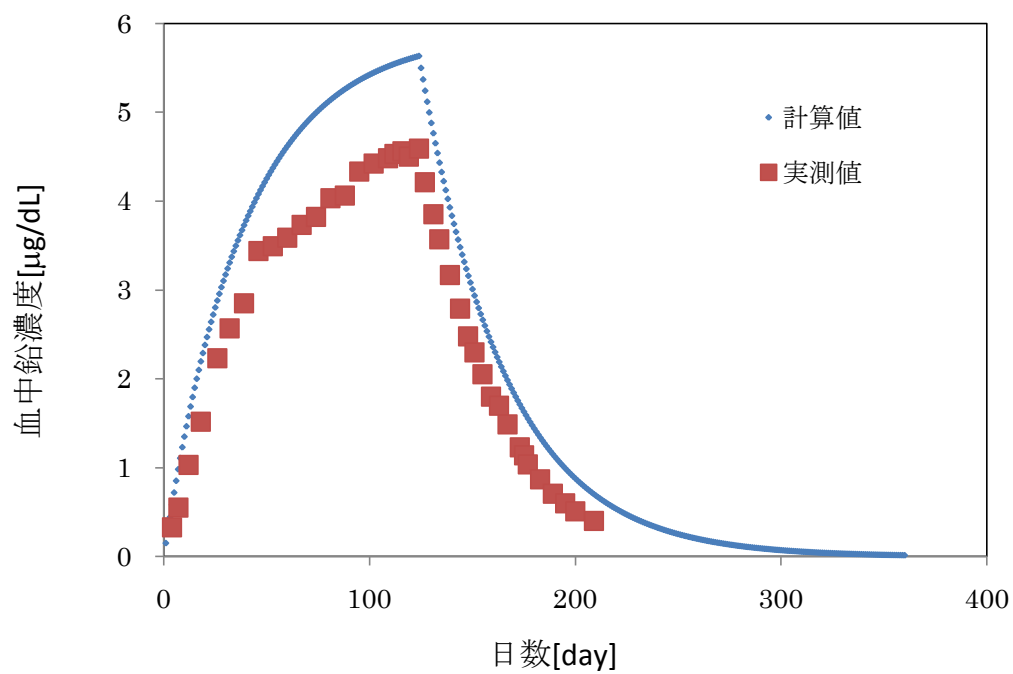


図 4-8. 対象 B のシミュレーション結果

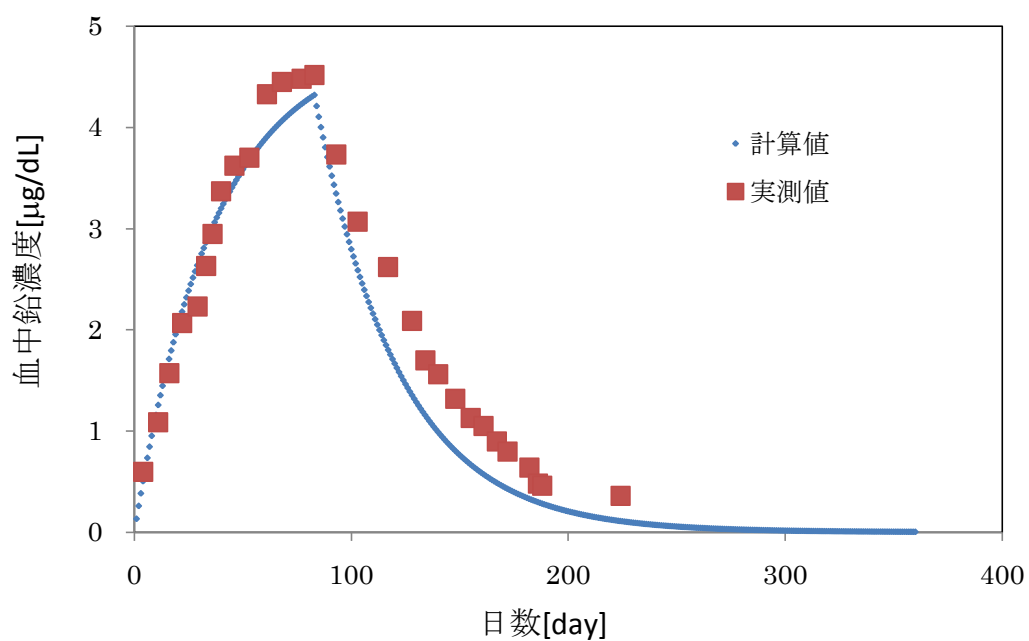


図 4-9. 対象 C のシミュレーション結果

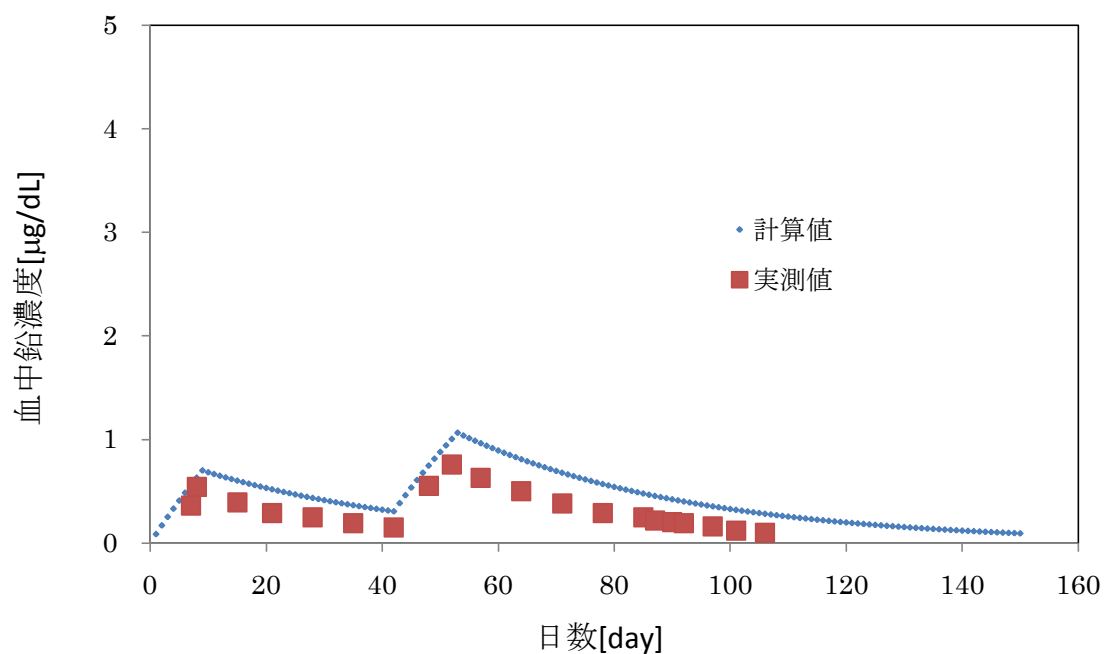


図 4-10. 対象 D のシミュレーション結果

図 4-7～図 4-10 より本研究で用いる脳のコンパートメントを追加した PBPK モデルで得られた血中鉛濃度の計算値はヒトを対象にしたトレーサー実験の実測値と良好に一致する結果を得た。



#### 4.5.2 脳-血漿移行パラメータの再設定

本研究では鉛における神経系への影響に着目しているため、血液から脳への移行、蓄積量が重要になる。しかし、本研究において使用された日高モデルにおける脳内鉛濃度は血液中鉛濃度を元にパラメータフィッティングされて計算されており、実際に脳中鉛濃度によってフィッティングされていない。よって、臓器・組織-血漿間分配係数における脳/血漿の値を変化させて血中鉛濃度への影響を試算した。臓器・組織-血漿間分配係数における脳/血漿の値を初期値 100 に対し 0.1、10、1000 とそれぞれ変化させたときの静脈血の 1 年間（365 日間）の鉛濃度の推移を示す、図 4-11 から分配係数 1000 においては実測値との乖離が見られたが、10、0.1 においては静脈血鉛濃度のシミュレーション結果に影響をほとんど与えなかった。よって、脳の臓器・組織-血漿間分配係数が比較的小さい場合、脳における臓器・組織-血漿間分配係数を血中鉛濃度を用いてフィッティングすることはできない。そこで、本研究では脳内における鉛移行量へのシミュレーションを行えるように脳の臓器・組織-血漿間分配係数パラメータを別に設定する。

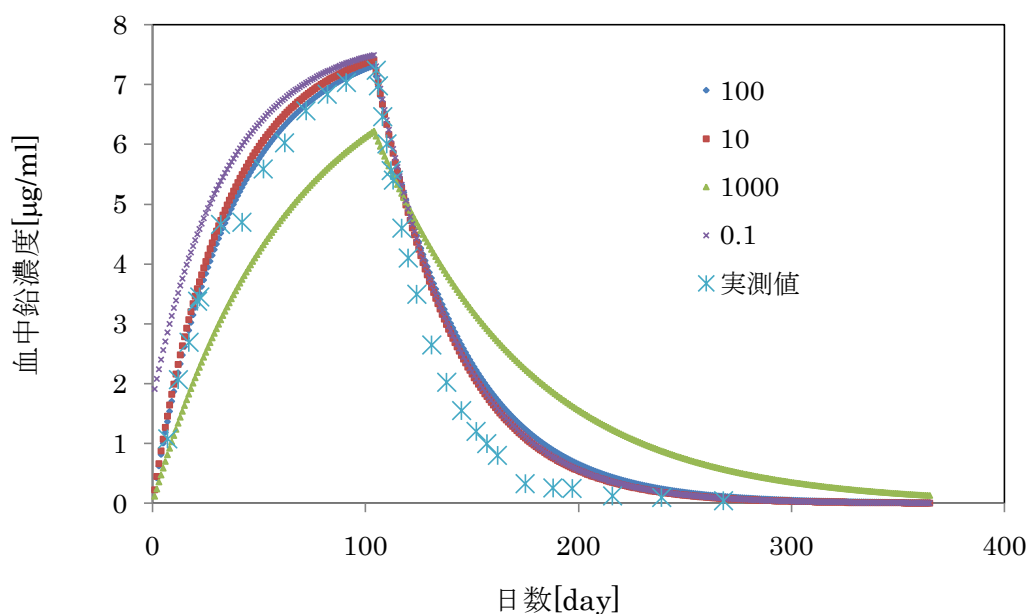


図 4-11. 脳における臓器・組織-血液間分配係数の変化に対するシミュレーション結果

しかし、現時点ではヒトの血中鉛濃度と脳内の鉛濃度に対応させるデータが確認されないため、ラットの実験データを元にパラメータを求め、その値をヒトに外挿する。Azar ら (Azar et. al., 1973) はラットを用いた鉛の慢性毒性実験において、血中、腎臓、肝臓、骨、脳、そ

それぞれの鉛濃度の測定を行った。表 4-4 に血中鉛濃度と脳中鉛濃度の結果の表を示す。

表 4-4. ラットに対する鉛の慢性毒性実験における各臓器濃度

(Azar et. al., 1973)	
血中鉛濃度 [μg/dL]	脳中鉛濃度 [mg/g]
12.7	0.14
11	0.19
18.5	0.28
35.2	0.38
77.8	1.06
16.4	0.11
98.6	0.88
98.4	1.48

式(4 - 8)を  $C_{pven,i}$  の関数と仮定し、 $C_{pven,i}$  は定数とすると  $C_{pven,i}$  は解の公式によって以下のように与えられる。

$C_{pven,i} =$

$$(C_{ven,i} - KBIND - 0.45 \times BIND) + \sqrt{(C_{ven,i} - BIND - 0.45 \times BIND)^2 - 4 \times KBIND \times C_{ven,i}} \quad (4-11)$$

また式(4-7)、より臓器中鉛濃度は血漿中鉛濃度を示す  $C_{pven,i}$  に臓器・組織-血漿間分配係数を掛けたものになるので、各臓器の鉛濃度は静脈血中鉛濃度との関係式に変形することができる。

$$C_i = P_i \times \left\{ (C_{ven,i} - KBIND - 0.45 \times BIND) + \sqrt{(C_{ven,i} - BIND - 0.45 \times BIND)^2 - 4 \times KBIND \times C_{ven,i}} \right\} \quad (4 - 12)$$

慢性毒性時における定常状態を仮定すると、 $C_{art}=C_{ven,i}$  が成立し、実験で得られた血中鉛濃度と式(4-12)を用いることで脳中鉛濃度を求めることが可能になる。各血中鉛濃度に対する脳中の鉛濃度をプロットし、臓器・組織-血漿間分配係数の値を変化させることで実験結果の実データとの比較を行う。実際は式(4 - 12)を一般関数とした回帰曲線を描くことで脳の最適な臓器・組織-血漿間分配係数  $P_{BR}$  の値をパラメータフィッティングにより決定する。図 4 - 12 にそのグラフを示す。

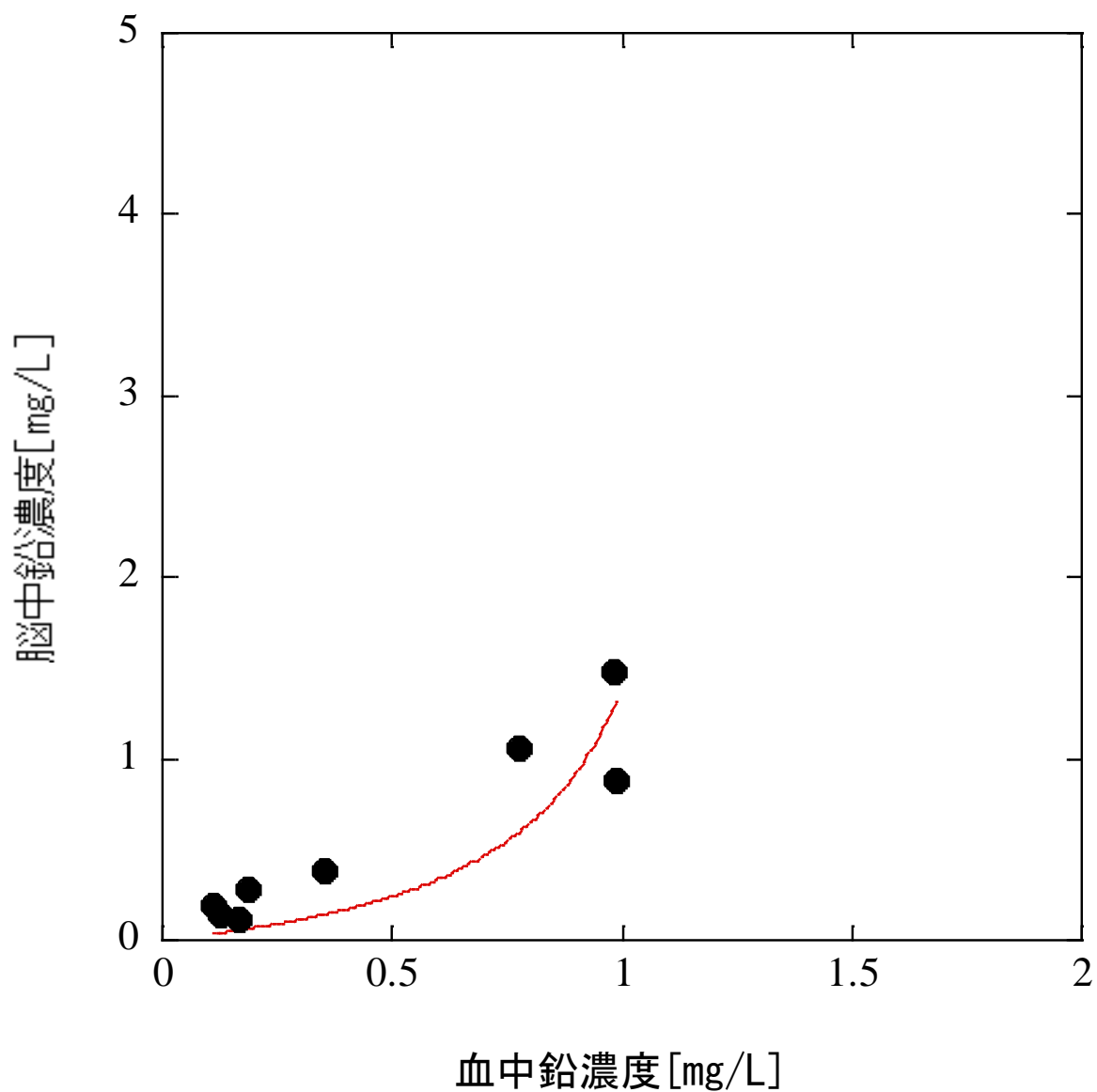


図 4-12. 脳における臓器・組織-血液間分配係数のパラメータフィッティング

図 4-12 で得られた回帰曲線から、脳の臓器・組織-血漿間分配係数  $P_{BR}$  は 47 と推定された。よって、本研究では他の臓器・組織-血漿間分配係数と有効数字を合わせ、 $P_{BR}$  として 50 を用いることにした。

この新しく再設定された臓器・組織-血漿間分配係数を用いてシミュレーションを行い、先の PBPK モデルに使用した Rabinowitz らの研究データを用い、モデルを検証する。対象 A での

シミュレーション結果を図 4-13 に示す。図 4-13 から脳における臓器組織 - 血漿間分配係数を 50 としてもシミュレーション結果が良好であることが示された。Appendix 1 に本研究で用いた PBPK モデルプログラムを示す。

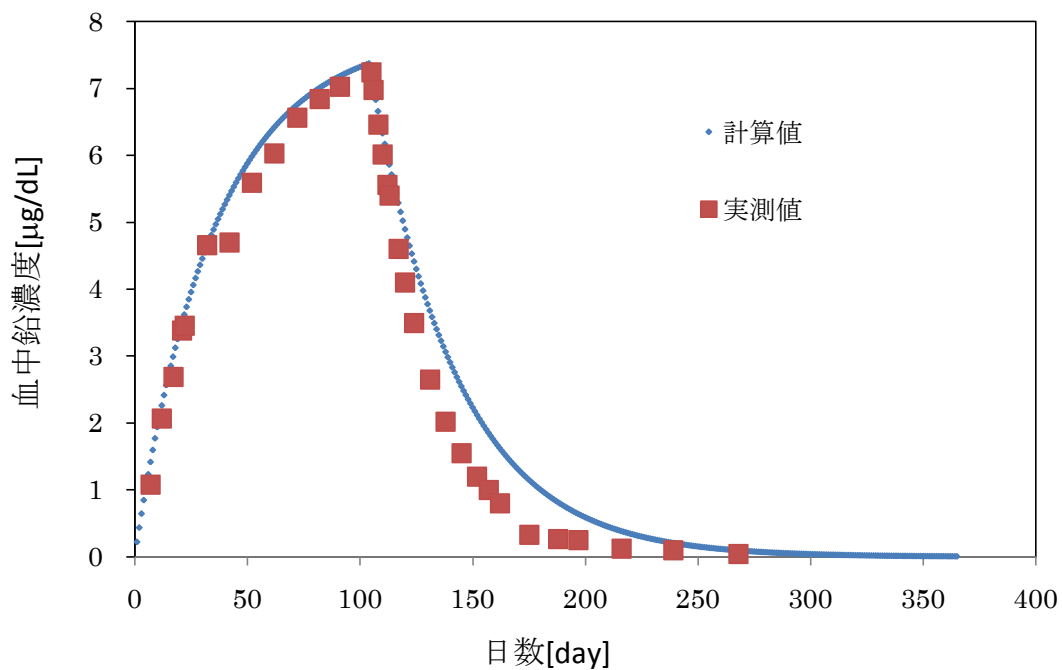


図 4-13. Rabinowitz らのトレーサー実験対象 A の条件による  
PBPK モデルの再シミュレーション結果

## 4.6 考察

### 4.6.1 暫定週間耐容摂取量におけるシミュレーション

1986 年 FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会は乳児と幼児に対する鉛の暫定週間耐容摂取量を  $25\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{bw} \cdot \text{week})$  ( $3.5\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{bw} \cdot \text{day})$ ) と定めた (WHO, 1995)。この値は 1993 年に幼児小児はすべての人口のなかで最も感受性が高い集団であるという前提に基づき、この週間耐容摂取量を全年齢に定めた。この暫定週間摂取量を用いて本研究によって再構築された PBPK モデルによるシミュレーションを行い、鉛の健康リスク評価を行う。体重には日本人の成人男子の代表値  $64.0\text{kg}$  (化学物質リスク管理研究センター, 2007) を用いた。その結果を図 4-14 に示す。

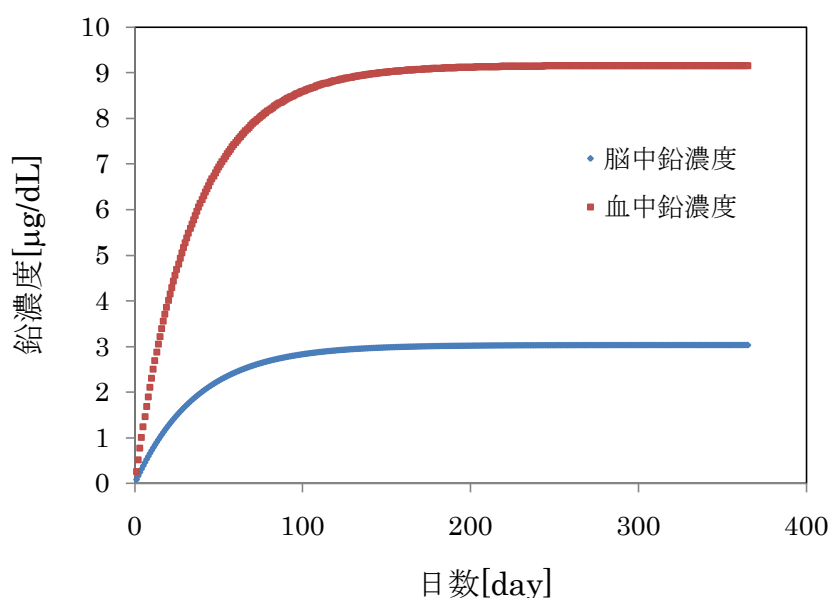


図 4-14. 鉛摂取量  $25\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{bw} \cdot \text{week})$  におけるシミュレーション結果

シミュレーションの結果から耐容摂取量である  $3.5\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{bw} \cdot \text{day})$  の鉛を毎日経口摂取したとき、1 年後、血中鉛濃度および脳中鉛濃度はそれぞれ  $9.2[\mu\text{g}/\text{dL}]$ 、 $3.0[\mu\text{g}/\text{dL}]$  と推定された。このときの脳中鉛濃度をモル濃度で表わすと  $1.4 \times 10^{-7}[\text{M}]$  と示される。第 3 章においてヒト神経細胞 NT2/D1 を用いた生存率試験で鉛濃度  $1 \times 10^{-6}[\text{M}]$  を超えると神経細胞の生存率が低下することが示されている。このことから本研究で得たシミュレーション結果はその値の約 1/10 となり、現在の基準値では神経毒性を及ぼす濃度には達しないことが示唆された。しかし、本研究におけるシミュレーションは成人男性を基準としたモデルとなっている。幼児小児期では血液脳関門は未成熟であるため、神経細胞が死亡するというかなり重篤な障害が予想される濃度である本研究で示された値よりも、さらに高い濃度で鉛の脳への移行・蓄積が起こる可能性も考えられる。また、血中鉛濃度が  $10\mu\text{g}/\text{dL}$  から  $20\mu\text{g}/\text{dL}$  に増加すると IQ が平均で 2.57 低下するという報告

(Schwartz J, 1994)もあり、本研究では血中鉛濃度が  $9.2 \mu\text{g/dL}$  で定常状態に達していることを考慮すると鉛の神経毒性を考慮した場合、シミュレーション結果における血中鉛濃度は  $10 \mu\text{g/dL}$  に近く、耐容摂取量として新たな基準値を設定する必要があると考えられる。

#### 4.6.2 亜慢性毒性時のシミュレーション

次に脳中の鉛濃度がヒト神経細胞の生存率に影響を及ぼす濃度である  $1 \times 10^{-6} [\text{M}]$  に達する鉛の一日経口摂取量をシミュレーションにより求めた。その結果を図 4-15 に示す。

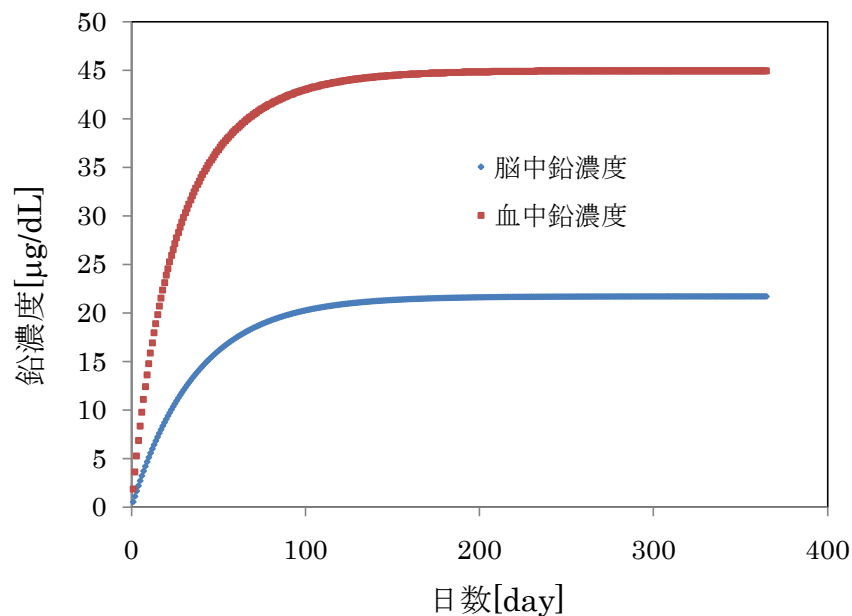


図 4-15.脳中濃度  $1 \times 10^{-6} [\text{M}]$  を達成するシミュレーション結果

シミュレーションより、定常状態に達したときに脳中鉛濃度が  $1 \times 10^{-6} [\text{M}]$  ( $\approx 20.7 \mu\text{g/dL}$ ) になる一日当たりの経口摂取量は  $25 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{bw} \cdot \text{day})$  と推定された。このときの血中鉛濃度は約  $45 \mu\text{g/dL}$  となり、神経行動学的影響が表れると、神経細胞の生存率から影響が示された報告されている  $40 \mu\text{g/dL}$  を超えるものであり、神経影響が表れ始める血中鉛濃度と脳中鉛濃度が対応する (Baker et al., 1983, Maizlish et al., 1995) 結果となった。よって、図 4-15 から成人男性が  $25 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{bw} \cdot \text{day})$  程度の鉛を摂取し続けた場合、100 日ほど経過すると、脳や中枢神経系に重篤な悪影響が生じる可能性が示唆される。

#### 4.6.3 急性毒性時のシミュレーション

4.6.1 および 4.6.2 では一定量の鉛を毎日摂取するという条件のもとでシミュレーションを行い、第 3 章で行った神経毒性実験の結果との比較を行った。第 3 章での曝露時間は 48 時間であり、

4.6.1、4.6.2 での亜慢性での曝露よりも急性曝露の影響も考えられる。よって、1 日のみ鉛を摂取したと仮定し、その時の脳鉛濃度が 48 時間以上にわたって  $1 \times 10^{-6} \text{[M]}$  ( $\approx 20.7 \mu\text{g/dL}$ ) を超えるときの摂取量をシミュレーションによって求める。図 4-16 にその結果を示す。

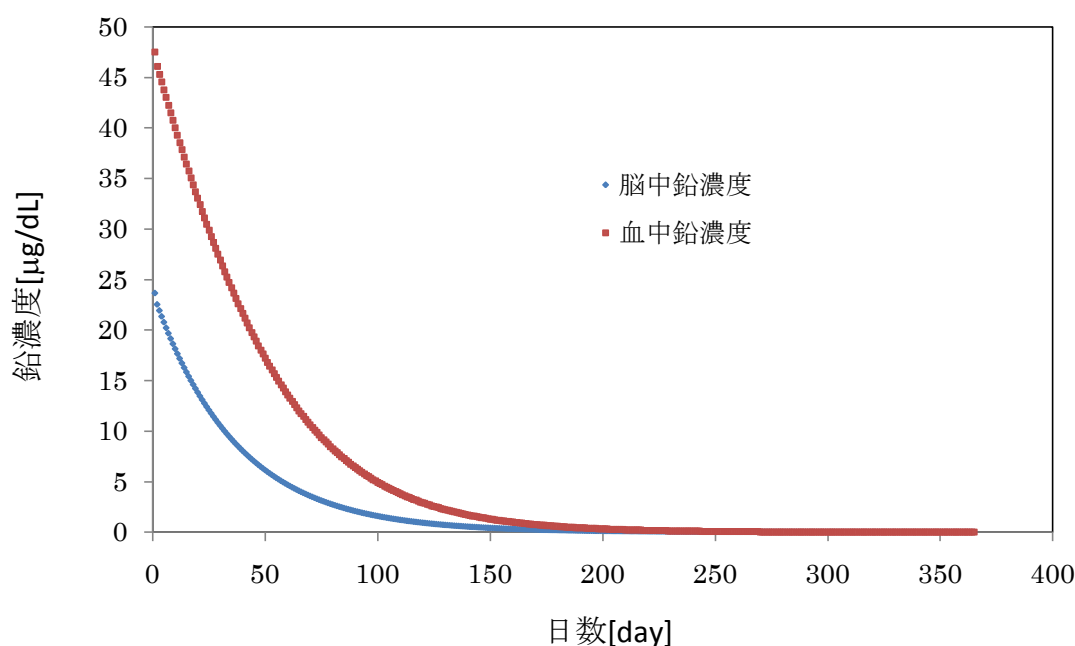


図 4-16. 鉛の急性毒性シミュレーション結果

シミュレーションより脳鉛濃度が 48 時間以上にわたって  $1 \times 10^{-6} \text{[M]}$  ( $\approx 20.7 \mu\text{g/dL}$ ) に達する際の鉛暴露量は  $1 \text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{bw} \cdot \text{day})$  と推定され、このときの血中鉛濃度は約  $48 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{bw} \cdot \text{day})$  と求められた。よって成人男性が  $1 \text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{bw} \cdot \text{day})$  程度の鉛を一時的に摂取した場合、1、2 日程度のうちに脳や中枢神経系に何らかの悪影響が表れる可能性を示唆している。

従来の動物実験においては鉛の曝露量に対する血中鉛濃度およびその症状によって鉛の神経毒性が決定され、鉛の毒性メカニズムを考慮しているとは言い難い部分があった。本研究においては神経細胞を用いた生存率試験を行うことで鉛の神経影響を細胞レベルで考慮している。この結果をもとに PBPK モデルを用いたシミュレーションを行うことで実際に神経影響が出ると考えられる鉛曝露量を推定することが可能になった。これらのことから神経毒性に着目した鉛の耐容摂取量を提言することもできると考えられる。

本研究においてヒトに対する鉛の PBPK モデルを構築し、様々なシミュレーションを行った。また、その前段階として *in vitro* 血液脳関門実験モデルを用いた実験と、神経細胞を用いた毒性試験を行った。*in vitro* 血液脳関門実験モデルを用いた試験によって今回新たに追加した脳のコンパートメントの臓器・組織-血漿間分配係数が鉛の濃度によらず一定であることが示された。

ここでまた神経細胞を用いた毒性試験結果と PBPK モデルを用いたシミュレーション結果を組み合わせるという新たなリスク評価手法を用いることで、神経毒性を主眼とした新たな耐容一日摂取量を求めることなどが可能になると考えられる。



## 参考文献

- Andersen ME, Toxicokinetic modeling and its applications in chemical risk assessment., 2003, *Toxicol Lett.*, 138(1-2), p9-27.
- Andersen ME, Physiological modeling of organic compounds., 1991, *Ann. Occup. Med.* 35, p305-321.
- Bischoff KB and Brown RH, Drug distribution in mammals., 1966, *Chem. Eng. Prog. Syst. Ser.*, 62, p33-45.
- Krishnan K and Andersen ME, Physiologically based pharmacokinetic modeling in toxicology. In Hayes AW, ed. *Principles and methods of toxicology*. 3rd ed., 1994, New York, NY: Raven Press, Ltd., p149-188.
- Andersen ME, Clewell HJ III, Gargas ML, Smith FA and Reitz RH, Physiologically based pharmacokinetics and the risk assessment process for methylene chloride., 1987, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 87, p185-205.
- Clewell HJ III and Andersen ME, Dose, species, and route extrapolation using physiologically based pharmacokinetic models. In: *Pharmacokinetics in risk assessment drinking water and health*, Vol. 8., 1987, National Academy Press, Washington, DC, p159-182.
- Gerlowski LE and Jain RJ, Physiologically based pharmacokinetic modeling: principles and applications., 1983, *J. Pharma. Sci.*, 72, p1103-1126.
- Himmelstein K and Lutz RJ, A review of the application of physiologically based pharmacokinetic modeling., 1979, *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 7, p127-137.
- Leung HW, Development and utilization of physiologically based pharmacokinetic models for toxicological applications., 1991, *J. Toxicol. Environ. Health*, 32, p247-267.
- National Research Council, *Drinking water and health*, vol. 6. Chapter 6., 1986, National Academy Press, Washington, DC.
- Clewell HJ III and Andersen ME, Risk assessment extrapolations and physiological modeling., 1985, *Toxicol. Ind. Health*, 1(4), p111-131.
- Andersen ME and Krishnan, Relating in vitro to in vivo exposures with physiologically based tissue dosimetry and tissue response models. In: Salem H, ed. *Animal test alternatives: Refinement, reduction, replacement.*, 1994, New York: Marcel Dekker, Inc., p9-25.
- O'Flaherty EJ, Physiologically based models for bone-seeking elements. I. Rat skeletal and bone growth., 1991a, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 111(2), p299-312.

- O'Flaherty EJ, Physiologically based models for bone-seeking elements. II. Kinetics of lead disposition in rats., 1991b, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 111(2), p313-331.
- O'Flaherty EJ, Physiologically based models for bone-seeking elements. III. Human skeletal and bone growth., 1991c, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 111(2), p332-341.
- O'Flaherty EJ, Physiologically based models for bone-seeking elements. IV. Kinetics of lead disposition in humans., 1993, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 118(1), p16-29.
- O'Flaherty EJ, Physiologically based models for bone-seeking elements. V. Lead absorption and disposition in childhood., 1995, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 131(2), p297-308.
- Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR, Beliles RP, Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic model, 1997, *Toxicol Ind Health*, 13(4), p407-84.
- 日高大彰, 鉛、ベンゼン、MTBE のリスクアセスメントに関する研究～ガソリンの組成変化と健康リスクの変遷～, 1999, 京都大学大学院工学研究科環境地球工学専攻修士論文
- Rabinowitz BM, Wetherill GW, Koppole JD, Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans, 1976, *J Clin Invest.*, 58(2), p260-270.
- Azar A, Trochimowicz HJ, Maxfield ME, Review of lead studies in animals carried out at Haskell Laboratory: Two year feeding study and response to hemorrhage study, *Environmental Health Aspects of Lead: Proceedings of International Symposium*, October 1972, Amsterdam, The Netherlands, p199-210.
- WHO, Environmental health criteria 165 Inorganic Lead, 1995.
- 独立行政法人産業技術総合研究所化学物質リスク管理研究センター, 2007, 曝露係数ハンドブック, URL: <http://unit.aist.go.jp/riss/crm/exposurefactors/>.
- Schwartz J, Low-Level Lead Exposure and Children's IQ: A Metaanalysis and Search for a Threshold, 1994, *Environ Res.*, 65(1), p42-55.
- Baker EL, Feldman RG, White RF and Harley JP, The role of occupational lead exposure in the genesis of psychiatric and behavioral disturbances., 1983, *Acta. Psychiatr. Suppl.*, 67, p38-48.
- Maizlish NA, Parra G, Feo O, Newrobehavioral evaluation of Venezuelan workers exposed to inorganic lead., 1995, *Occup. Environ. Med.*, 52, p408-414.

## Appendix 1

(本研究で構築した PBPK モデルで使ったプログラム。Visual Basic にて記述)

(体重、摂取量はシミュレーションを行うたびに適切な値にセッティングした)

(出力するワークシートも適宜変更した)

Option Explicit

Option Base 1

Sub PBPK10

' Hidaka-type of PBPK model for Pb [Programmed 2007.07.09]

' Add Brain Compartment and check by Shusuke Tani[Revised 2010.12.15]

' For model calibration with Human experiment data

' Modified for incorporating the brain compartment

' Modified for considering the growth with age

' \*\*\*\*\*

' \*\*\* Declaration of Parameters \*\*\*

' \*\*\*\*\*

' Parameter for roop calculation control

Dim i As Long, j As Integer, k As Integer, m As Integer

Dim Cinh As Double, Oral As Double, CAL As Double

' Parameters for controlling results output

Dim ic As Long, iic As Long

ic = 0

iic = 0

' Tend: Period for simulation [day]

' DT: Time increment for simulation [day]

' Tstep: Number of time step for simulating a day [1/day]

' Age: Age parameter for simulation [day]

' Yage: Age parameter for simulation [year]

Dim Tend As Long, DT As Double, Tstep As Long, Age As Double

Dim Yage As Integer, Tage As Integer, Iyear As Integer

Tstep = 10000

DT = 1 / Tstep

Tend = Tstep \* 365

' Suffix for identifying each organ/tissue

' 1: Liver

' 2: Kidney

' 3: Rapidly perfused organ/tissue

' 4: Slowly perfused organ/tissue

' 5: Bone

' 6: Brain

' 7: Venous blood

' 8: Arterial blood

' YY(): Lead concentration at  $t=t+dt$  in each organ/tissue [mg/L]

' BYY(): Lead concentration at  $t=t$  in each organ/tissue [mg/L]

' FF(): Time derivative of YY at  $t=t$

' CPv(): Lead concentration in venous blood plasma of each organ/tissue [mg/L]

' Cv(): Lead concentration in venous blood of each organ/tissue [mg/L]

Dim YY(8) As Double, BYY(8) As Double, FF(6) As Double

Dim CPv(6) As Double, Cv(6) As Double

' Setting blood flow rate

' BW: Body weight [kg]

' Q: Cardiac output [ L/day]

' Qa: Alveolar ventilation [L/day]

' qq(): Blood flow into the tissue/organ [ L/day]

' V(): Volume of organ/tissue [ L]

' P(): Partition coefficient of lead between blood plasma and organ/tissue [ - ]

Dim BW As Double, Q As Double, Qa As Double

Dim qq(6) As Double, V(6) As Double, P(6) As Double

' Setting partition coefficient

P(1) = 100

P(2) = 100

P(3) = 100

P(4) = 20

P(5) = 1000

P(6) = 50

' Setting absorption rate of lead

' AGI: Absorption coefficient for dietary (oral) intake [ - ]

' ALU: Absorption coefficient for respiratory (lung) intake [ - ]

Dim AGI As Double, ALU As Double

AGI = 0.11

ALU = 0.5

' Setting partitioning coefficient

' BIND: Partition constants of lead between blood and blood plasma [mg/L]

' KBIND: Partition constants of lead between blood and blood plasma [mg/L]

Dim BIND As Double, KBIND As Double

BIND = 2.7

KBIND = 0.0075

' Setting elimination constants

' KELI: Lead clearance rate coefficient from liver [1/day]

' KEKI: Lead clearance rate coefficient from kidney [1/day]

Dim KELI As Double, KEKI As Double

KELI = 0.2

KEKI = 0.47

```

' Simulatio for Subject C

    BW = 64

' *****

' ***   Start of simulation   ***
' *****

' Setting initial conditions

    For k = 1 To 8

        BYY(k) = 0

    Next k

For i = 1 To Tend

    Age = i * DT
    Yage = Int(Age / 365)
    ic = ic + 1

' Setting organ/tissue volume
' V(): Volume of tissue/organ depending on age
' For liver

    V(1) = 0.04 * BW ^ 0.85
' For kidney

    V(2) = 0.0085 * BW ^ 0.84
' For Brain

    V(6) = 2 * BW / 100
' For rapidly-perfused organ/tissue

    V(3) = 0.1 * BW ^ 0.85 - V(1) - V(2) - V(6)
' For bone

    V(5) = 0.002 * 0.039 * BW ^ 1.02
' For slowly-perfused organ/tissue

    V(4) = BW - V(1) - V(2) - V(3) - V(5) - V(6)

```

' Setting blood flow rate [L/day] depending on age through Body weight

$$Q = 340 * BW ^ 0.74$$

$$Qa = 1.01 * Q$$

$$qq(1) = 0.25 * Q$$

$$qq(2) = 0.17 * Q$$

$$qq(3) = 0.32 * Q$$

$$qq(4) = 0.09 * Q$$

$$qq(5) = 0.05 * Q$$

$$qq(6) = 0.12 * Q$$

' Setting lead intake rate

' Through inhalation: Cinh ([mg/L])

' 1,000,000 is unit conversion factor of micro-g/m3 to mg/L

' Resp data is given in micro-g/m3 unit

$$Cinh = 0$$

' Through Dietary exposure: Oral([mg/day])

If (Age < 83) Then

$$Oral = 0.105$$

Else

$$Oral = 0$$

End If

' Calculation of each time-derivative

For m = 1 To 6

$$CPv(m) = BYY(m) / P(m)$$

$$Cv(m) = 0.55 * CPv(m) + 0.45 * CPv(m) * (1 + BIND / (KBIND + CPv(m)))$$

Next m

$$FF(1) = (qq(1) / V(1)) * (BYY(8) - Cv(1)) + AGI * Oral / V(1) - KELI * BYY(1)$$

$$FF(2) = (qq(2) / V(2)) * (BYY(8) - Cv(2)) - KEKI * BYY(2)$$

For j = 3 To 6

$$FF(j) = (qq(j) / V(j)) * (BYY(8) - Cv(j))$$

Next j

' Calculation of lead concentration

For j = 1 To 6

$$YY(j) = BYY(j) + FF(j) * DT$$

Next j

For m = 1 To 6

$$CPv(m) = YY(m) / P(m)$$

$$Cv(m) = 0.55 * CPv(m) + 0.45 * CPv(m) * (1 + BIND / (KBIND + CPv(m)))$$

Next m

$$YY(7) = 0$$

For j = 1 To 6

$$YY(7) = YY(7) + (qq(j) * Cv(j)) / Q$$

Next j

$$YY(8) = (Q * YY(7) + ALU * Qa * Cinh) / Q$$

' Converting the calculated concentration to next initial value

For j = 1 To 8

$$BYY(j) = YY(j)$$

Next j

' Preparation for printing out

If (ic = Tstep) Then

$$ic = 0$$

$$iic = iic + 1$$

$$\text{Worksheets("Subject-A")}.Cells(iic + 1, 1) = \text{Age}$$

$$\text{Worksheets("Subject-A")}.Cells(iic + 1, 2) = YY(1)$$

$$\text{Worksheets("Subject-A")}.Cells(iic + 1, 3) = YY(2)$$



```
Worksheets("Subject-A").Cells(iic + 1, 4) = YY(3)
Worksheets("Subject-A").Cells(iic + 1, 5) = YY(4)
Worksheets("Subject-A").Cells(iic + 1, 6) = YY(5)
Worksheets("Subject-A").Cells(iic + 1, 7) = YY(6)
Worksheets("Subject-A").Cells(iic + 1, 8) = YY(7)
Worksheets("Subject-A").Cells(iic + 1, 9) = YY(8)
End If

Next i

End Sub
```

## 第 5 章 結論

最後に各章で得られた成果について総括するとともに、今後の研究に対する課題及び展望について述べる。

第 1 章では鉛のさまざまな性質について述べるとともに鉛の毒性に対する報告を整理した。そして本研究の研究目的を定め、被験物質を酢酸鉛(II)三水和物、硝酸鉛(II)、塩化鉛(II)に設定した。

第 2 章では鉛の血液脳関門への影響を調べるため *in vitro* 血液脳関門実験モデルを用い、経皮内電気抵抗測定実験と鉛透過量測定実験を行い以下の結果を得た。

(1) 豚脳微小血管内皮細胞への鉛化合物曝露における生存試験で、経皮内電気抵抗測定実験を行う鉛化合物濃度を決定した。

(2) 豚脳微小血管内皮細胞を用いた *in vitro* 血液脳関門モデルを用いた経皮内電気抵抗測定実験により、鉛化合物曝露において経皮内電気抵抗値が時間、鉛化合物濃度それぞれに依存して低下することが示された。経皮内電気抵抗値の低下により、鉛化合物曝露によって血液脳関門を形成する豚脳微小血管内皮細胞のタイトジャンクションが減少したことを示唆している。

また、各鉛化合物 10 $\mu$ M 曝露における経皮内電気抵抗値の比較により、鉛化合物の種類によらず、同等にその値が低下していることから、鉛化合物の陰イオン部分には関係なく、鉛によって経皮内電気抵抗値が低下していることが示されている。このことは、鉛そのものが血液脳関門に影響を与えていることを示唆している。

(3) *in vitro* 血液脳関門モデルを用いた鉛透過試験で ICP-MS を用いた測定結果から、脳側を模しているウェル側で、鉛が存在することが確認された。このことは鉛曝露によって血液脳関門が解放され、解放された血液脳関門を通過して鉛が脳に取り込まれていることを示唆している。

(4) *in vitro* 血液脳関門モデルにおいて曝露日数と鉛の透過量に関しては直線関係を示し、鉛の透過速度係数は鉛の濃度によらず一定であることが示された。この結果は PBPK モデルを構築する際に、脳における臓器・組織-血液間分配係数が鉛濃度に関係なく一定であり、定数として決定できることを示している。

第 3 章では鉛化合物の神経毒性に対する容量反応関係を明らかにするためラットおよびヒト由来のグリア細胞、神経細胞を用いた生存率試験を行い、以下の結果を得た。

(1) 鉛化合物曝露に対する神経毒性試験において鉛化合物の種類による各種細胞への生存率曲線に差異は見られなかった。

(2) 酢酸鉛(II)三水和物濃度 3mM においてそれぞれの細胞の生存率はラット由来グリア細胞 C6

で71.8%、神経細胞PC12で37.1%、ヒト由来グリア細胞CCF-STTG1で74.1%、神経細胞NT2/D1で0.6%を示した。硝酸鉛(II)3mM における生存率はラット由来グリア細胞 C6 で54.6%、神経細胞 PC12 で47.9%、ヒト由来グリア細胞 CCF-STTG1 で70.1%、神経細胞 NT2/D1 で0.8%を示した。塩化鉛(II)3mM の曝露における生存率はラット由来グリア細胞 C6 で97.5%、神経細胞 PC12 で52.9%、ヒト由来グリア細胞 CCF-STTG1 で70.9%、神経細胞 NT2/D1 で0.5%を示し、グリア細胞と神経細胞を比較したとき、神経細胞において生存率の低下が見られた。これにより細胞腫の違いが表れることが示唆された。

(3)ラット由来神経細胞とヒト由来神経細胞を比較したときヒト由来神経細胞においてより生存率の低下が見られ、種差による違いが表れることが示唆された。

(4)酢酸鉛(II)三水和物、硝酸鉛(II)濃度 10mM の曝露においてはいずれの細胞腫においても10%以下の生存率を示した。これにより高濃度の鉛化合物曝露においては細胞毒性を示すことが示された。

(5)本章での実験結果から鉛に対する感受性が一番高かったヒト神経細胞 NT2/D1 における細胞死への影響を及ぼさない最大鉛濃度は  $1 \times 10^{-6}$ [M]となった。この濃度を超えると細胞死の影響が表れると考えられこの値を神経毒性のエンドポイントの濃度としてリスク評価に使用した。

第4章では鉛に対するヒト PBPK モデルについて説明し、新たに脳のコンパートメントを加えたモデルを構築し、健康リスク評価シミュレーションを行い、以下の結果を得た。

(1)鉛における PBPK モデルに神経系への評価に重要な要素となる脳のパラメータを追加し、モデルの改良を行った。

(2)ラットにおける曝露実験データを用いて脳における臓器・組織・血漿間分配係数を再設定し、その値に生物学的根拠を持たせた。

(3)改良した PBPK モデルを用い、鉛の摂取量から脳への蓄積量を推定し、シミュレーション結果から神経系に着目したリスク評価を行った。FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議によって策定された鉛の暫定週間耐容摂取量  $25 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{bw} \cdot \text{week}) (=3.5 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{bw} \cdot \text{day}))$  を用いてシミュレーションを行った結果、約150日で各臓器および血中の鉛濃度は定常状態に達した。このときの脳中鉛濃度は  $3.0 [\mu\text{g}/\text{dL}]$  と推定され、モル濃度で表わすと  $1.4 \times 10^{-7}$ [M]となった。この値は第3章で求めたヒト神経細胞 NT2/D1 の生存率に影響を及ぼす濃度である  $1.0 \times 10^{-6}$ [M]の約1/10であった。また、このときの血中鉛濃度は  $9.0 [\mu\text{g}/\text{dL}]$  と推定され成人において鉛の毒性が観察される  $10.0 \mu\text{g}/\text{dL}$  を下回ったものの、幼児小児への影響を考慮する場合、基準値の新たな設定が必要であることが示唆された。

また、ヒト神経細胞 NT2/D1 の生存率に影響を及ぼす濃度である、 $1.0 \times 10^{-6}$ [M]に達する鉛濃

度を亜慢性、急性それぞれの曝露条件をシミュレーションより求めた。その結果、亜慢性では  $25\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{bw} \cdot \text{day})$  を毎日摂取することで、急性では  $1\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{bw})$  を一度に摂取することで脳  
中鉛濃度が設定値を超えることが計算された。

本研究においてヒトに対する鉛の PBPK モデルを構築し、様々なシミュレーションを行った。  
また、その前段階として *in vitro* 血液脳関門実験モデルを用いた実験と、神経細胞を用いた毒性  
試験を行った。*in vitro* 血液脳関門実験モデルを用いた試験によって今回新たに追加した脳のコン  
ンパートメントの臓器・組織-血漿間分配係数が鉛の濃度によらず一定であることが示された。  
ここでまた神経細胞を用いた毒性試験結果と PBPK モデルを用いたシミュレーション結果  
を組み合わせるという新たなリスク評価手法を用いることで神経毒性を主眼とした新たな耐  
容一日摂取量を求めることなどが可能になると考えられる。

本研究では鉛の神経毒性に着目したヒト健康リスク評価を行ったが本研究において構築された  
鉛の PBPK モデルは成人を対象にしている。鉛の神経毒性に関しては成人よりも幼児・小児にお  
いて成人よりも低濃度でその影響が表れることが報告されている。よって、今後必要とされる研  
究として、さらなるリスク評価を行うためには幼児・小児に適応できる PBPK モデルを構築する  
必要がある。その際、血液脳関門は幼児・小児においては未発達であり、年齢とともに形成され  
ること考慮するため、幼児・小児期の微小血管内皮細胞を用いた *in vitro* 血液脳関門実験モデル  
を構築し、鉛濃度と臓器・組織-血漿間分配係数の間に関係があるのかを透過試験によって求  
める必要があると考えられる。また、神経細胞への影響として、本研究では生存率を用いた  
が、より低濃度で発言する神経細胞に対する悪影響をエンドポイントとして評価することも  
考えられる。

## 謝辞

本博士論文は様々な人たちの助けを得て完成させることができました。

昨年度、定年により退官されました森澤眞輔名誉教授には京都大学博士後期課程に入学させていただききっかけを与えていただきました。森澤先生の現役時に論文を完成させることができなかったのは今でも申し訳なく思っております。

米田稔教授には森澤先生が研究室を移動された後、自分の面倒を見ていただきました。本来は研究分野の違いもあり、指導の面で大変ご迷惑をおかけいたしました。しかし、米田先生がおられなければこの論文を出すこともできませんでした。

中山亜紀准教授は自分が京都大学に編入学して後、直接ご指導を賜る立場となりました。しかし、自分のふがいなさからいろいろな面でいちばんご迷惑を長い間かけてしまったのは中山先生に対してだと思えます。

先生方に対しては普通であれば放逐されてもおかしくない立場でありながらそれぞれ暖かいご配慮、粘り強いご指導、ご助力を賜ることができ、謝辞という文章でありながらいくら書いても書ききれないほどの感謝をいたしております。この論文を提出することでまず一つご恩返しができたと思います。もちろん一生感謝を忘れません。

研究室の皆さまとも長すぎではありましたが楽しい研究生生活を過ごさせていただきました。2002 年度に編入学をしてからこの論文を提出する 2010 年度の 9 年にわたり、研究室の皆さまとのたくさんの出会いと別れがありました。学位をとることに無駄に年月を費やしてしまうことはマイナスの要素が大きいことではありますが環境リスク工学講座の研究室でともに研究を行った皆様とたくさん出会うことができたのは無理やりながらも一つのプラスだと思っております。

そして、現在 33 歳になる自分を暖かく見守り、ここまで育てていただいた両親にはやっとなつの結果を示すことができました。本来であればもっと早くに独り立ちをせねばならないのですが自分の中の様々な要因によってここまで先延ばしにしていまいしました。自分は三人兄弟の真ん中であり、兄は就職し実家を旅立った後、結婚し、すでに二人のお子さんを設けております。また、弟は昨年就職し、実家を旅立って行きました。すでに両親も定年退職し、悠々自適の生活を送るだけというところに入っていますが宙ぶらりんの状態の自分が居残ることによって両親には絶え間ない心配を与えてきたと思います。

博士後期課程の8年間および研究員としての1年間、合計9年間はいろいろな人に多大な迷惑をかけるとともにいろいろな方々の自分に対する暖かいご協力を感じることができました。もちろんここが終わりではなくスタートですし、ここからいよいよ皆さんから受けたいろいろな御恩を返せることになると思います。本当にありがとうございました。